

THESIS

WÜRZBURG

1967

Lehrstuhl für Experimentelle Zahnheilkunde
(Vorstand: Professor Dr. F. Bramstedt)
an der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und
Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg
(Direktor: Professor Dr. R. Naujoks)

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA

ALDOLASEAKTIVITÄT UND GLUKOSEUMSATZ BEI
NEISSERIEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfasst und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Rolf Hermann
aus Schrobenhausen

Würzburg 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153518_0098

Lehrstuhl für Experimentelle Zahnheilkunde
(Vorstand: Professor Dr. F. Bramstedt)
an der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und
Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg
(Direktor: Professor Dr. R. Naujoks)

ALDOLASEAKTIVITÄT UND GLUKOSEUMSATZ BEI
NEISSERIEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfasst und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Rolf Hermann
aus Schrobenhausen

Würzburg 1967

Referent: Professor Dr. F. Bramstedt

Tag der Promotion: 24. 11. 67

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung.	1
A. Die Rolle der Nahrung unter besonderer Berücksichtigung der Kohlenhydrate.	1
B. Die Rolle der Mikroorganismen des Mundes.	4
C. Die biochemische Kariesforschung.	7
II. Material.	11
III. Methodik.	12
A. Vorbereitung der Bakteriensuspension für die Versuche.	12
B. Erstellung der Eichkurve.	12
C. Bestimmung der Aldolaseaktivität.	13
D. Messung des Sauerstoffverbrauchs.	20
E. Bestimmung des Glukoseverbrauchs.	21
F. Statistik.	23
IV. Ergebnisse.	25
V. Diskussion.	49
VI. Zusammenfassung.	56
VII. Literaturverzeichnis.	57-66

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Seit vor fast 80 Jahren der Robert-Koch-Schüler Miller die Zahnkaries als einen chemisch-parasitären Prozess definierte, hat diese Theorie bis heute keine Widerlegung erfahren, sondern ist im wesentlichen nur ergänzt worden. Eine besondere Bedeutung wird heute drei Hauptpunkten, nämlich der Rolle der Nahrung und insbesondere der der Kohlenhydrate, den Mikroorganismen des Mundes und den biochemischen Forschungsergebnissen in der Kariesätiologie beigemessen.

A. DIE ROLLE DER NAHRUNG UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER KOHLENHYDRATE:

Als einer der ersten wies schon 1939 P.O. Pedersen (68) auf den Zusammenhang zwischen Nahrungszusammensetzung und Zahnkaries hin. Während die zivilisierten Eskimos Ostgrönlands, die von den Essensgewohnheiten ihrer Vorfahren abgewichen waren und sich an europäische Hauptnahrungsmittel, wie Zerealien und Zucker, angepasst hatten, eine starke Kariesanfälligkeit aufwiesen, zeigten die primitiv lebenden Eskimos, die sich vor allem von Walfleisch, Tran und Speck, also animalischen Produkten, ernährten, einen Kariesbefall von 2% der Untersuchten. Diese Ergebnisse erschienen noch eindeutiger, als an präkolonisatorischen Eskimoschädeln dieser Gegend nur 0,38% mit Karies vorgefunden wurden.

In vielen europäischen Ländern wurde das Phänomen des Kariesrückgangs während des zweiten Weltkrieges studiert und mit dem Wiederanstieg nach dem Kriege verglichen (2,41,67,70,72,80). Dabei fiel auf, dass der gleiche Prozentsatz der Kalorien durch Kohlenhydrate gedeckt wurde, dass aber das Angebot von raffiniertem oder gereinigtem Zucker weitgehend durch höhermolekulare, natürliche Zucker, wie Stärke, ersetzt wurden. Auch zwang die Nahrungsmittelknappheit und -verteuerung die Menschen in der damaligen Zeit, ihre

Zwischenmahlzeiten und das Essen von Süssigkeiten einzuschränken. Bramstedt und Mitarbeiter (12) stellten fest, die kalorisch unterwertige Nahrung der damaligen Zeit wäre reich an Vitaminen der B-Gruppe, Vit. B₁, B₂, Nikotinsäure, auf Grund der stärkeren Ausmahlung des Brotes gewesen und hätte eine grössere Anzahl von Phosphatverbindungen enthalten, die den Kohlenhydratabbau beschleunigen würden, da sie als Coenzyme in diesen Prozess eingriffen.

In den letzten 15 Jahren fanden Untersuchungen mit dem Thema: "Ernährung und Karies" weltweite Beachtung. Dobkowsky (23) fand bei Indianern in Ekuador, die extrem hartes Brot und gerösteten Mais als Hauptnahrung zu sich nahmen, sehr wenig Karies, die zudem bei reinrassigen Stämmen wesentlich niedriger als bei mischrassigen lag. Driak (24) zeigte an 87 Buschmännern, dass 83, die keine Beziehung zur Zivilisation hatten, kariesfrei waren, während die restlichen Vier, die mit der Zivilisation in Berührung standen, Karies aufwiesen. Afonsky (1) untersuchte 3349 Studenten in der Provinz Hunan in Zentralchina. Von 95830 untersuchten Zähnen waren nur 2,46% kariös. Reis, Kohl und anderes Gemüse, geringe Fett- und Eiweissmengen waren die Hauptnahrung, wobei die überwiegende Zahl der Studenten unterernährt war. Von 18 untersuchten Diabetikern hatte nur einer kariöse Defekte.

Bei vergleichenden Untersuchungen, die auf Veranlassung der Weltgesundheitsorganisation in allen Teilen der Welt an 21000 Menschen durchgeführt wurden, kam man zu der erstaunlichen Feststellung, dass Vitaminwerte weit unter der Norm keinen Kariesanstieg zur Folge hatten (71). MacGregor (55) konnte bei Untersuchungen in Ghana diese Feststellung untermauern und zugleich beobachten, dass auch Mineralstoffmangel in der Ernährung keine Rolle bei der Zahnfäulnis spielt.

Die Tatsache, dass dem Zucker allein und zwar in seiner raffinierten Form unter den Nahrungsfaktoren eine grundlegende Bedeutung zukommt, stellt Baume (4) eindringlich durch sei-

ne Untersuchungen an 15000 polynesischen Kindern fest. Die früher an Eiweiss, Vitaminen und Mineralstoffen ausreichende, an Zucker arme Kost wurde im Laufe der letzten 30 Jahre durch billige Importe, die hauptsächlich aus Zucker, Reis und Brot bestanden, ersetzt. Die Folge ist die "polynesische Karies", wie Baume sie nennt. Die dünne Schmelzschicht, die auf die eiweiss- und kalziumarme Kost während der Zahntwicklung zurückzuführen ist, wird bald abgekaut und der Zahn ist nicht mehr zu retten, da die Polynesier zudem keine Mundhygiene kennen. Mit 15 Jahren ist bereits die Hälfte der Jugend zahnlos oder zumindestens teilprothesenbedürftig. Ausnahmen machten nur Kinder, die auf abgelegenen Inseln lebten, die trotz Fehlen von Mundhygiene und zahnärztlicher Betreuung wenig Karies aufwiesen. Hier kamen die einzigen kariesfreien Gebisse vor, die alle eine gewisse Schmelzfluorose zeigten, was auf einen erhöhten Fluorgehalt des Trinkwassers zurückzuführen war.

In zahlreichen Tierversuchen an Hamstern, Meerschweinchen und Ratten konnten diese aus der Ernährungsphysiologie gewonnenen Erkenntnisse bestätigt werden. Besonders Ratten eigneten sich für diese Experimente, da die Stellen der Nahrungsretention bei Rattenmolaren sehr ähnlich den Grübchen und Fissuren sind, die an menschlichen Seitenzähnen gefunden werden (65). Dabei zeigten Diäten mit hochmolekularen Zuckern, wie Stärke und Dextrin, keinen, Diäten mit niedermolekularen Zuckern, wie Saccharose, Fruktose, Glukose, dagegen einen signifikanten Kariesanstieg (22,35,36,40,45,73). Der kariogene Effekt erhöhte sich durch trocken verfütterte, klebrige, zuckerhaltige Nahrung (22,37). Ausserdem zeigten Tiere, die nach Belieben zuckerhaltige Kost fressen konnten, eine deutliche Karieszunahme gegenüber solchen, die zu bestimmten Zeiten damit gefüttert wurden (33,38). Eindeutig konnte durch die Verfütterung einer Kost, die keinerlei Zucker enthielt, nachgewiesen werden, dass ohne Zucker keine Karies hervorgerufen werden kann. Auch wenn die Speicheldrüsen entfernt worden waren, trat bei den Tieren, die zucker-

frei ernährt wurden, keine Karies auf, obwohl in diesem Falle bei Mensch und Tier sonst eine floride Karies einsetzt (74). Kite (49) ergänzte diese Erkenntnis, indem er Tiere über längere Zeit mittels Magensonde fütterte und darnach feststellte, dass die Zähne sauber und gesund geblieben waren.

In den bekannten Vipeholmversuchen konnten Gustafson und Mitarbeiter (34) zeigen, dass vermehrte Zuckeraufnahme die Karies ansteigen lässt. Die Gefahr der Zahnkaries wächst mit der Zufuhr einer klebrigen Nahrungsform, da diese leicht retiniert wird. Besonders durch die Aufnahme zuckerhaltiger Nahrung zwischen den Hauptmahlzeiten lässt sich leicht Karies hervorrufen.

B. DIE ROLLE DER MIKROORGANISMEN DES MUNDES:

Wie stellt sich die Funktion der Mikroorganismen in der neueren Kariesforschung dar? Nach Berger (9) ist praktisch jede beim Menschen vorkommende Keimart auch in der Mundhöhle angetroffen worden. Sie ist die Körperhöhle mit der buntesten Mischflora. Dabei unterscheidet Berger die Standardflora, die man regelmässig in jeder gesunden Mundhöhle antrifft, von der Durchgangsf flora, die selten zu finden ist. Auch als Nährboden für Bakterien unterscheidet sich die Mundhöhle in zweifacher Hinsicht. Einmal stellen sich abschilfernde Epithelzellen der Gingiva und der sonstigen Mundschleimhaut, ausserdem Ablagerungen am Zahn als eine feste Form des Nährbodens dar. Zum anderen kann man den Speichel als eine flüssige Form des Nährbodens ansehen. Zwischen beiden Phasen besteht ein inniger Austausch. Dass den Bakterien eine führende Rolle im Kariesgeschehen zukommt, zeigten Orland und Mitarbeiter (65) an keimfrei aufgezogenen Ratten, die kariesfrei blieben, obwohl sie zuckerhaltige Nahrung bekamen, die im Kontrollversuch bei 38 von insgesamt 39 Tieren kariöse Läsionen hervorrief.

Die Zahnbeläge oder Plaques und der Speichel als Lebensraum für die Mundbakterien zogen das Interesse der Kariesforschung der letzten 20 Jahre besonders auf sich. Wenn man die von Richardson und Jones (69) im Speichel vorgefundenen Bakterienarten, die bei der Karies eine Bedeutung haben, mit denen von Gibbons und Mitarbeitern (32) aus Plaques gezüchteten vergleicht, so kann eine auffällige Zunahme der Streptokokken in den Plaques gegenüber im Speichel festgestellt werden. Nach Berger (9) soll auch die Laktobazillenzahl in den Plaques im Gegensatz zum Speichel erhöht sein. Larmers (52) gibt an, dass die Bakterienflora der Mundhöhle durch ein ausgewogenes Zusammenspiel der milieubestimmenden Faktoren sich zusammensetzt. Je nachdem die Gärungs- oder Fäulnisvorgänge überwiegen, kommt es zu einem Ansteigen der acidophilen bzw. der fusospirochätären Formen der Mundflora. Vor allem Retentionsstellen sind Brutstätten für acidophile Bakterien, da sich die alkalisierende Wirkung des Speichels an diesen Stellen nicht auswirkt. Kariesresistente Menschen haben dementsprechend wenig acidophile Keime, was durch Clement et al. (21) durch vergleichende Untersuchungen an Buschmännern und kariesresistenten und kariesanfälligen Amerikanern bestätigt wird.

Auf die wesentlichere Rolle der Streptokokken, insbesondere des *S. salivarius*, gegenüber den Laktobazillen beim Kariesprozess wurde erstmalig 1939 (10) hingewiesen. Vor allem fiel die grössere Zahl, die stärkere Säureproduktion der Streptokokken im Gegensatz zu den Laktobazillen in das Gewicht, die die Säureproduktion dagegen über längere Zeit aufrecht erhalten.

Bei der Entkalkung des Schmelzes spielt ein p_H -Absinken auf 5,7 und 3 mM/kg Körpergewicht freier Milchsäure in den Plaques keine Rolle, da diese Werte ebenfalls bei kariesfreien Personen vorgefunden wurden (21). Nach Briner und Francis (16) ist zur Entkalkung des Schmelzes kein Abfall in stark saure p_H -Werte nötig. In ihren Versuchen zeigten durch Milchsäure aus dem Schmelz gelöste Phosphate eine starke Pufferwirkung,

indem sie freie H^+ -Ionen banden. Dabei war die Milchsäureproduktion umso höher, je mehr Phosphate aus dem Schmelz gelöst wurden. Das besagt, eine hohe Pufferkapazität verbessert die Lebensbedingungen für die Säurebildner, da ein Absinken in ungünstige, stark saure Bereiche vermieden wird.

Den ständigen Zuckerabbau, der nötig ist, damit die Säureproduktion anhält, glauben Gibbons und Mitarbeiter (30,31) in den Mikroorganismen, die intracellulär Polysaccharide speichern und diese bei mangelndem Zuckerangebot wieder in die Monosaccharide abbauen, gefunden zu haben. Es handelt sich dabei um Streptokokken (66), die von Keyes (48) aus Hamsterplaques isoliert wurden und Karies auf resistente Tiere übertrugen. Bramstedt (15) findet im Gegensatz zu dem von Gibbons als Amylopectin-Typ beschriebenen Polysaccharid ein glykogenähnliches. Dieses Polysaccharid hatte dieselben Bausteine wie das, das aus menschlichen Plaques kariesanfälliger Personen gezüchtete Streptokokken bildeten.

Wenn die Streptokokken auf Grund ihrer geschilderten Eigenschaften in der Kariesforschung genau untersucht wurden und Keyes sogar einen Streptokokkenstamm aus Hamsterplaques isolierte, der Karies auf kariesresistente Tiere übertrug, so tappt man nach Berger (8) über die Funktion, die die Neisserien bei der Kariogenese spielen, noch im Dunkel. Die Neisserien werden regelmässig in den Plaques gefunden (9,32), wobei Richardson und Jones (69) den Neisserien sogar eine Bedeutung als Index für pathologische Veränderungen in der Mundhöhle zuschreiben. Die zahlenmässig wichtigsten Stämme der Neisserien, 75-85%, die in der Mundhöhle vorkommen, vereinigen zwei Eigenschaften in sich. Einmal können sie Zucker abbauen. Dies geschieht auf oxydativem Wege. Dabei liegt der p_H -Wert bei 5,5. Zum anderen haben die Neisserien die Fähigkeit, Polysaccharide zu bilden (8, 42,43). Snyder et al. (75) glauben, es handle sich um ein Amylopectin. Für die Polysaccharidsynthese wird von den Neis-

serien Saccharose und Glukose-1-Phosphat verwendet. Ob die Polysaccharide bei der Bildung der Plaques eine Bedeutung haben, dürfte vom Synthesemass und von den Löslichkeitsverhältnissen abhängen. Hehre et al. (42) und Snyder et al. (75) stellten fest, dass das von Neisserien gebildete Polysaccharid durch Speichel löslich ist. Neubauer und Berger (61) dagegen hielten das Polysaccharid für unlöslich.

Eine weitere Fähigkeit der Neisserien ist ihre Verwertung organischer Säuren (8). Die gleiche Eigenschaft haben die anaerob lebenden Veillonellen (57). An Substrat mangelt es in den Plaques nicht. Im Speichel dagegen entstehen beim Glukoseabbau durch die Mundflora die meisten Säuren des Krebszyklus (62,63). An *Veillonella alcalescens* wurde gezeigt, dass im Speichel und in den Plaques kariesbefallener Individuen die Keime, die Säuren abbauen und so das Milieu alkalisieren, viel zahlreicher sind als bei kariesfreien Personen (57). Thoma (79) nimmt an, dass die Neisserien immer mit den säurebildenden Keimen zusammen bei der Schmelz-~~x~~karies angetroffen werden, weil sie die Fähigkeit zur Verarbeitung der Säuren besitzen.

C. DIE BIOCHEMISCHE KARIESFORSCHUNG:

Lundqvist (53) fiel bei den schon erwähnten Vipeholmversuchen auf, dass zwischen Karies und einer langen "oral sugar clearance time", worunter man die Elimination der Zucker aus dem Speichel versteht, eine Beziehung besteht, was Tenscher und Fosdick (78) bestätigen. Swenander Lanke (77) führte diese Erscheinung auf physikalische und mechanische Ursachen zurück, wie es zum Beispiel hohe Frequenz der Kaugewegungen, starker Speichelfluss und niedrige Viskosität des Speichels sind. Ausserdem führte sie noch die hohe Amylaseaktivität als Ursache für eine beschleunigte "oral sugar clearance time" an. Dieses Enzym ist fast ausschliesslich im Parotisspeichel enthalten (3). Heute neigt man dazu,

der Amylase bei der Karies keine Bedeutung einzuräumen (5, 46, 51).

Diese Erscheinung der "oral sugar clearance time" suchte man auf biochemischen Wege zu klären. Es fiel auf, dass der Sauerstoffverbrauch im Speichel kariesanfälliger Personen niedriger als im Speichel kariesresistenter ist (19, 25, 58).

Der unterschiedliche Sauerstoffverbrauch kariesanfälliger und -resistenter Personen wird sogar als Kariestest diskutiert, da er viel früher als klinische Untersuchungsmethoden einen Karieshinweis ergibt (50).

Bramstedt und Vonderlinn (11) prägten dabei den Begriff der physiologischen Kariesresistenz, der besagt, ein Patient gilt als kariesresistent, wenn trotz hoher DMF-Zahl (Deseased, Missing, Filled Teeth) auf Grund vieler Füllungen und Extraktionen seit zwei Jahren keine Karies mehr auftrat.

Da Blausäure und Kohlenmonoxyd die O_2 -Aufnahme stark hemmen, nahm man an, diese Hemmung im Sauerstoffverbrauch auf einen Enzymausfall zurückzuführen (11). Diese Enzyme sind an die Mikroorganismen der Mundhöhle gebunden (20, 77). Aldolase und Hexokinase als wesentliche Enzyme des Zuckerabbaues waren im Speichel von kariesanfälligen Personen in wesentlich geringeren Enzymeinheiten als bei kariesresistenten festzustellen (13, 14, 47, 59). Trümper (81) konnte diese Erscheinung nicht nachweisen, stellt aber fest, dass vernachlässigte Mundpflege und Entzündungen die Aldolaseaktivität des Speichels erhöhen.

Auch die Verbrennung organischer Substrate, wie Glukose, Brenztraubensäure u.a., war im Speichel Kariesanfälliger bei in vitro-Versuchen vermindert. Dabei konnte durch Zusatz energiereicher Phosphate eine Steigerung der Verbrennung bei Kariesanfälligen teilweise bis an die Werte der Kariesresistenten erreicht werden (12). Im Mittelpunkt des Interesses stand der Abbau der Glukose. In vielen Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Glukoseabbau bei Kariesresistenten verstärkt war (13, 26, 59). Volker und Pinkerton (82) wiesen nach, dass nach dem Essen zuckerhaltiger Nahrungs-

mittel die Konzentration der Glukose im Speichel stark anstieg, besonders wenn die Nahrung eine weiche und klebrige Konsistenz hatte. Nach 5 Minuten war das Maximum der Konzentration im Speichel erreicht und nach 30 Minuten hatten sich die Ausgangswerte der Glukose noch nicht eingestellt, wobei deutliche Unterschiede in der Konzentration der Glukose im Speichel bei den einzelnen Probanden auftraten.

In neueren Untersuchungen (28,54) wurde in vitro nachgewiesen, dass C^{14} -markierte Glukose sogar gesunde Schmelzstrukturen durchdringt, vor allem aber schnell in Schmelzdefekte und entlang von Schmelzlamellen eindringt.

Besser als Glukose werden die Disaccharide Maltose und Saccharose verbrannt (26), bei denen wiederum die Spaltung bei kariesresistenten Personen eindeutig erhöht war (60).

Wenn wesentliche Enzyme des Zuckerabbaues bei kariesanfälligen Personen gehemmt sind, wenn die Sauerstoffaufnahme als Zeichen einer oxydativen Verbrennung der Zucker verringert ist und auch der Zuckerabbau selbst verlangsamt ist, so kann mit einem längeren Verweilen und einer hohen Konzentration der Zucker im Speichel gerechnet werden, die wiederum günstige Verhältnisse für die in den Plaques lebenden Mikroorganismen schaffen (14,59).

Strålfors (76) geht in seiner Kariestheorie davon aus, dass die Karies wesentlich von einem kontinuierlichem Zuckervorrat und Zuckerabbau in den Plaques abhängt. Dieser immer vorhandene Zuckervorrat hat durch die Entdeckung polysaccharidbildender Bakterien in den Zahnbelägen seinen Nachweis erfahren. Die Zucker werden bis auf die Stufe der Milchsäure abgebaut und es wird durch das Ansteigen der Säurekonzentration ein so hoher Spiegel in den Plaques erreicht, dass es zur Entkalkung des Schmelzes kommt.

Wenn aus dem Speichel in die Zahnbeläge nicht mehr genügend Zucker diffundiert, dann sollen, wie Gibbons und Socransky (30) feststellten, die Bakterien ihre im Zellinnern gespeicherten Polysaccharide abbauen. Damit ist eine gesteigerte Milch-

säureproduktion verbunden.

Als Beginn der Entstehung der Plaques werden die von den Mikroorganismen extracellulär gebildeten Polysaccharide angesehen (29,83).

Bei Untersuchungen kariöser Defekte lag der p_H -Wert im kariösen Schmelz und Dentin weit niedriger als in der gesunden Zahnschmelz und es konnte gezeigt werden, dass die Säure vor den Bakterien in die gesunde Zahnschmelz eindringt. Unter Füllungen mit gutem Randschluss wurde dabei keine Säurebildung trotz Anwesenheit von Mikroorganismen festgestellt (39). Dieses Ergebnis wird ergänzt durch elektronenmikroskopische Beobachtungen kariöser Läsionen. Helmcke (44) stellt dabei fest, dass die Bakterien, die der kariös veränderten Zahnschmelz am nächsten sind, Zerfallserscheinungen, wie Vakuolisierung im Zellinnern und Austreten von Zellinhalt, zeigen. An diese Bakterienzone schliesst sich eine Zone von Keimen, die sich lebhaft teilen und so einen hohen Vitalitätsgrad haben. Helmcke konnte diese Bakterien nicht identifizieren.

Nach dieser Übersicht über die moderne Kariesforschung ergibt sich als Quintessenz: Den Säuren als Abbauprodukten der Zucker und den Bakterien wird heute eine noch bedeutendere Rolle im Kariesgeschehen eingeräumt. Als Kariesbeginn wird die Bildung von Plaques angesehen.

Deshalb wurden in dieser Arbeit die noch wenig auf ihre Beziehung zur Karies untersuchten, aber regelmässig im Speichel und in den Plaques vorgefundenen Neisserien auf ihre Aldolaseaktivität, einem wesentlichem Enzym des Zuckerabbaues, und auf ihren Glukoseumsatz untersucht.

II. MATERIAL

Zur Untersuchung gelangten aus Plaques-Material eines kariesanfälligen Patienten gezüchtete Neisserien (N 103, Schäfer KA), mit denen sterilisierte Schrägagarröhrchen beimpft wurden, die 24 Stunden bei 35-37°C im Brutschrank standen. Der Nährboden setzte sich aus 12,5 g Heart-Infusion-Broth und 6 g Agar-Agar (Difco) zusammen, die in 500 ml destilliertem Wasser durch 20-30 Minuten langes Kochen im Wasserbad gelöst wurden. Von den 24 Stunden alten, bewachsenen Schrägagarkulturen wurde Bakterienmaterial mit einer Impföse in 5 ml, keimfrei gemachte Nährlösung (12,5 g Heart-Infusion-Broth in 500 ml destilliertem Wasser gelöst) übertragen. Diese wurde 10 Stunden auf der Schüttelapparatur im Brutschrank geschüttelt, um gleichmässige Wachstumsbedingungen für sämtliche Bakterien zu schaffen. Von der bewachsenen Flüssigkeitskultur wurde mittels steriler Pipette 1 ml entnommen und mit keimfreier, 0,9%-iger NaCl-Lösung auf 1:10 verdünnt. Davon wurden nunmehr 0,1 ml in 100 ml fassende Erlenmeyer-Kolben pipettiert, die jeweils 40 ml sterile Nährlösung enthielten, deren Zusammensetzung der Flüssigkeitskultur entsprach. Aldolaseaktivität, Glukoseumsatz und Wachstumsbestimmung der Neisserien erfolgte nach 6,8,10,12,14,16,18 und 20 Bebrütungsstunden.

III. METHODIK

A. VORBEREITUNG DER BAKTERIENSUSPENSION FÜR DIE VERSUCHE:

Die bebrütete Nährbouillon, von der die Wachstumsdichte im Photometer Eppendorf durch Messung bei einer Wellenlänge von 578 m μ bestimmt wurde, wurde 20 Minuten bei 5000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Darauf folgte eine zweimalige Waschung des Sediments mit physiologischer NaCl-Lösung; dabei wurde jeweils 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nun konnte das Sediment mit 0,9%-iger Kochsalzlösung aufgenommen werden und wurde mit Hilfe des Homogenisators (Typ Potter-Elvehjem) gleichmässig verteilt. Die Bakteriensuspension musste solange verdünnt werden mit 0,9%-iger NaCl-Lösung, bis sich im Photometer Eppendorf (Filter 578 m μ) eine Extinktion von 0.400 gegen physiologische Kochsalzlösung als Leerwert ergab. Dabei wurden Küvetten mit 20 mm Schichtdicke verwendet.

B. ERSTELLUNG DER EICHKURVE:

Von den so vorbereiteten 10, 12, 14, 16, 18, 20 Stunden bebrüteten Bakterienkulturen wurde die Dichte des Bakterienwachstums photometrisch bestimmt, wobei die Verdünnung der bewachsenen Nährbouillon mit physiologischer Kochsalzlösung 1:20 betrug.

Hierauf wurden von den verschieden lang bebrüteten Kulturen Verdünnungsreihen von 10^7 und 10^8 mit steriler physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Davon wurde je 1 ml auf jeweils 3 sterile Petrischalen mit keimfreier Pipette übertragen. In die Petrischalen wurde darauf flüssiger Heart-Infusion-Broth-Agar gegossen. Die Temperatur betrug ca. 47°C. Nach dem Festwerden liess man die Platten 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C bebrüten. Nach dieser Zeit konnten die makroskopisch gut sichtbaren, gewachsenen Kolonien aus-

gezählt werden.

Bebrütungs- zeit in Stunden	Nephelometr. Werte	Ausgezählte Bakterienkol. bei Verdünnung 10^7	Ausgezählte Bakterienkol. bei Verdünnung 10^8
10	0.294	über 473	45
12	0.240	223	24
14	0.190	194	15
16	0.162	67	6
18	0.112	49	5
20	0.092	17	1

Tab. 1:

Gewachsene Bakterienkolonien in Zusammenhang mit verschiedenen Bebrütungszeiten und nephelometrischen Werten pro ml Bakterienkultur. Siehe Abb. 1 und 2.

C. BESTIMMUNG DER ALDOLASEAKTIVITÄT:

LÖSUNGEN:

1.) Collidinpuffer/Fruktose-1,6-Diphosphat (CLP/FDP)

Collidin 0.056 M, $p_H=7,4$

Monojodacetat (Na-Salz) 0.0003 M

Fruktosediphosphat (Na-Salz) 0.002 M

Diese Lösung wird vor Gebrauch mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml verdünnt.

2.) Reduziertes Diphosphopyridinnucleotid (DPNH)

DPNH 0.015 M

Wird mit 2 ml 1%-iger Natriumbikarbonat-Lösung vor dem Versuch gelöst.

3.) Glycerophosphat-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase (GDH/TIM)

GDH/TIM 2 mg Enzymprotein/ml

Abb.1: Wachstumsdichte der Neisserien nach verschiedenen Bebrütungszeiten. Die Verdünnung der bewachsenen Kultur mit 0,9%-iger NaCl-Lösung betrug 1:20 (Siehe auch Tab.1).

Abszisse: Bebrütungszeit in Stunden.

Ordinate: Neph.578 m μ = Im Photometer Eppendorf mit Filter 578 m μ gemessene Werte.

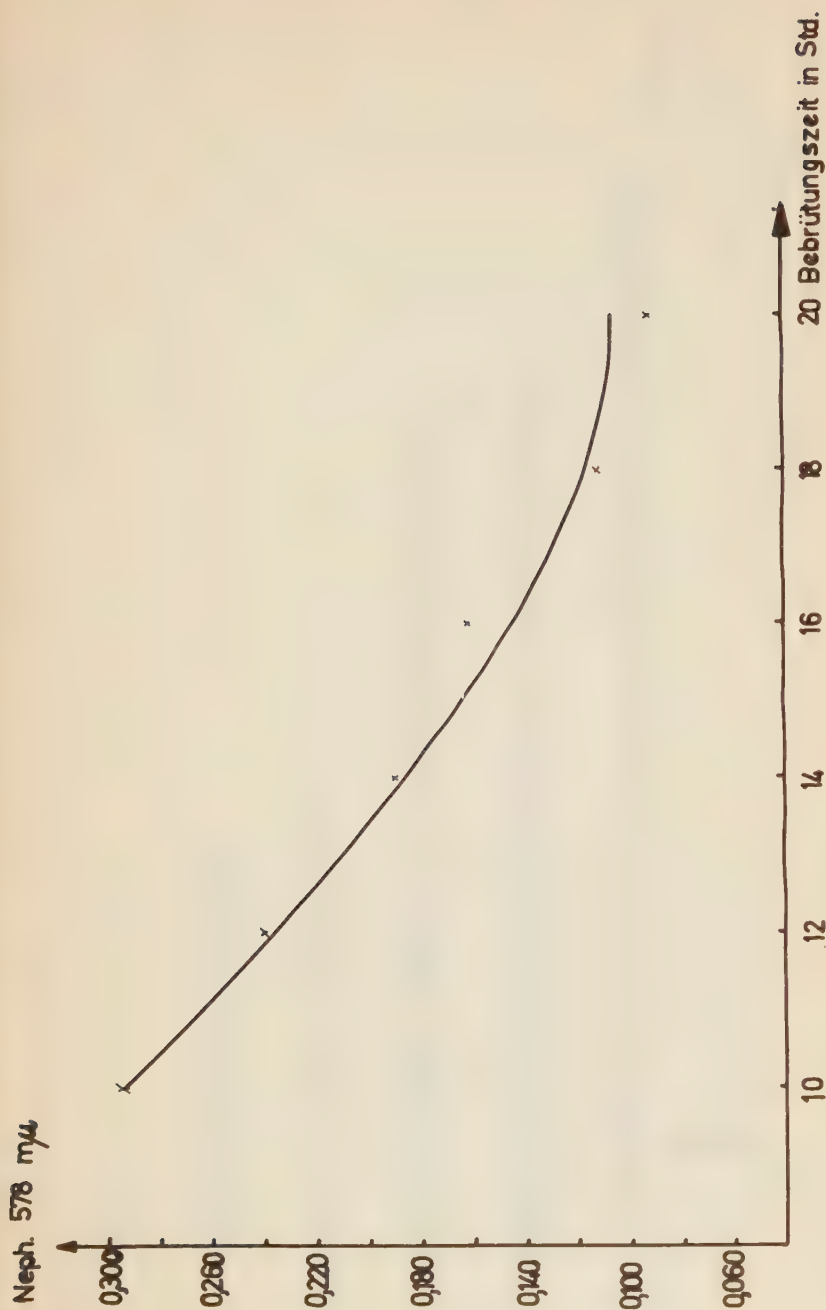
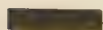


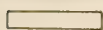
Abb. 1

Abb.2: Ausgezählte Kolonien der Neisserien nach ca. 48 Stunden Bebrütung. Es wurden Verdünnungen von 10^7 und 10^8 mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Jeder Wert ist das Mittel aus 3 Parallelwerten.

Abszisse: Gezählte Bakterienkolonien multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor.

Ordinate: Bebrütungszeit in Stunden.

 = Verdünnung von 10^8

 = Verdünnung von 10^7 (Siehe Tab.2)

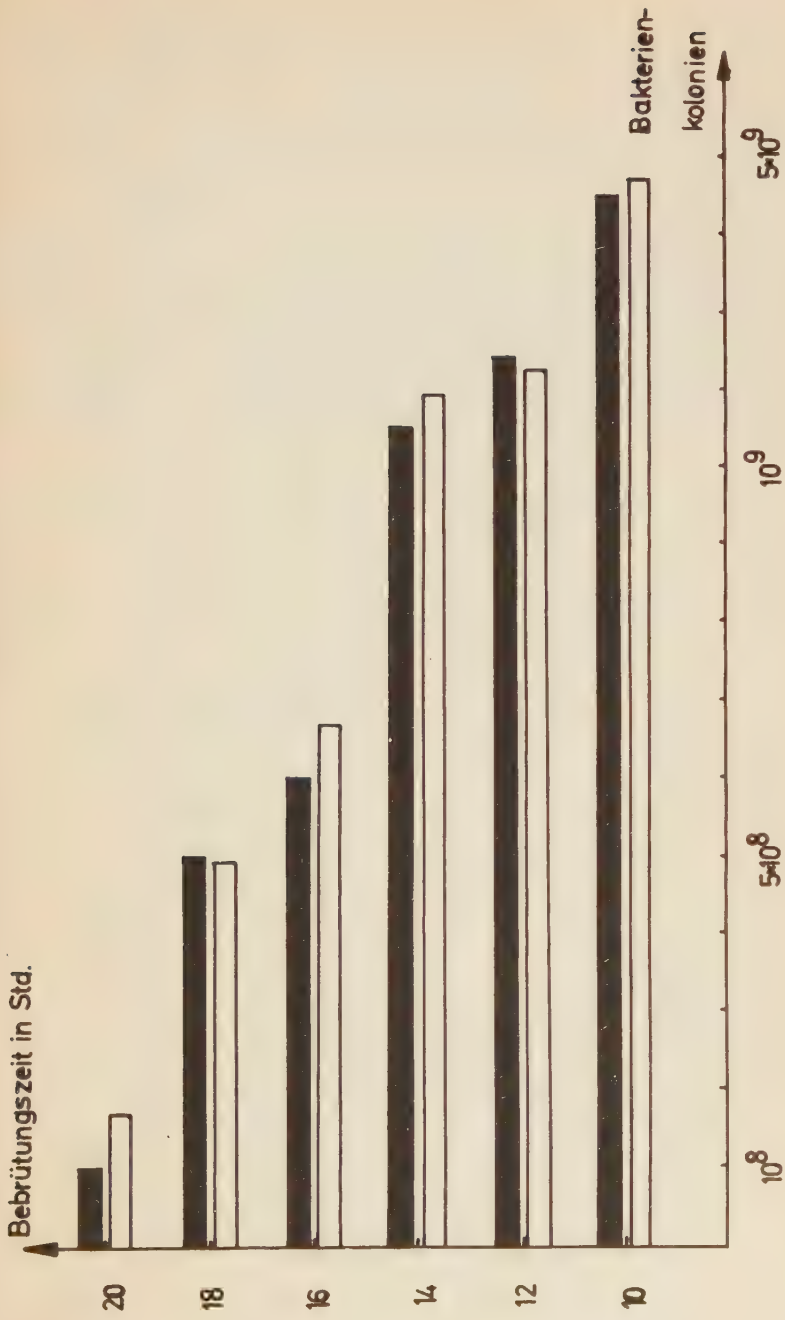


Abb. 2

ANSATZ:

CLP/FDP	2,75 ml
DPNH	0.05 ml
GDH/TIM	0.01 ml
Bakteriensuspension	0.20 ml

VERSUCHSABLAUF:

Nach Durchmischen des Ansatzes kam dieser in ein thermo-konstantes Wasserbad von 37°C. Nach 5 Minuten wurde das Reaktionsgemisch in eine 10 mm Küvette überführt und weiterhin bei einer Temperatur von 37°C gehalten, um den optimalen Reaktionsbedingungen zu genügen. Der Versuch hatte eine Dauer von 20 Minuten; dabei wurde alle 2 Minuten abgelesen. Als Leerwert diente physiologische Kochsalzlösung. Gemessen wurde die Abnahme von DPNH bei einer Wellenlänge von 366 mμ im Photometer Eppendorf.

PRINZIP:

Das Enzym Aldolase ist beim Zuckerabbau eingeschaltet und katalysiert folgende Reaktion:

- 1.) Fructose-1,6-Diphosphat (FDP) $\xrightarrow{\text{Aldolase}}$ Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) + Dihydroxy-Aceton-Phosphat (DAP). Die beiden Triosephosphate stehen miteinander über die Enolform im Gleichgewicht, das zu 90% auf der Seite des DAP liegt und durch das Enzym TIM beschleunigt wird. Die Bestimmung der Aldolaseaktivität ergibt sich aus den pro Zeiteinheit aus FDP gebildeten Triosephosphaten. Dabei wird DAP mit DPNH katalysiert durch das Enzym GDH und vollständig in Glycerophosphat übergeführt nach der Formel:
- 2.) $2 \text{ DAP} + \text{DPNH} + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{GDH}} 2\alpha\text{-Glycerophosphat} + 2 \text{DPN}^+$
Insgesamt läuft folgende Reaktion ab:
- 3.) $\text{FDP} + 2 \text{DPNH} + 2\text{H}^+ \longrightarrow 2\alpha\text{-Glycerophosphat} + 2 \text{DPN}^+$
Der Verbrauch von DPNH, der photometrisch bestimmt wird, ist also direkt dem gespaltenem FDP proportional.

BERECHNUNG:

Der Abbau von organischen Substanzen (in diesem Fall FDP), der durch den Zusatz verschiedener Enzyme ausgelöst wird, kann über die Fähigkeit des Lichtes, dass es bei bestimmten Wellenlängen durch bestimmte Zusätze (bei diesem Versuch durch DPNH) absorbiert wird, verfolgt werden. Das im Laufe des Versuches dehydrierte DPNH, das im UV-Bereich bei 366 mμ seine grösste Lichtabsorption aufweist, nimmt in seiner Fähigkeit, das Licht zu absorbieren, desto mehr ab, je grösser die Menge des DPN⁺ wird. Nach dem allgemeinen Schwächungsgesetz der Lichtintensitäten wird dieses durch Messung im Photometer feststellbare Phänomen als Extinktion (E) bezeichnet.

$$1.) E = \frac{\log \frac{I_0}{I}}{\log I} = \epsilon \cdot d \cdot c$$

I_0 = einfallender Lichtstrom (Lichtintensität ohne Zugabe des spezifischen Substrates).

I = ausfallender Lichtstrom (Lichtintensität nach Zugabe des spezifischen Substrates).

ϵ = Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke (cm)

c = Konzentration (Mol/cm³)

$$2.) \epsilon = \frac{\log \frac{I_0}{I}}{d \cdot c} \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{Mol} \cdot \text{cm}} = \frac{\text{cm}^2}{\text{Mol}} \right]$$

Für DPNH beträgt der molare Extinktionskoeffizient

bei 366 mμ:

$$\epsilon = 3,30 \cdot 10^6 \left[\frac{\text{cm}^2}{\text{Mol}} \right]$$

Gemäss der Internationalen Union für Biochemie (IUB) wird die Enzymaktivität auf 1.00 ml Untersuchungsmaterial bezogen und die Einheit als diejenige Enzymmenge definiert, die bei 25°C in 1 Minute 1 μMol Substrat umsetzt.

TESTBEDINGUNGEN:

Bakteriensuspension: 0.2 cm³, Extinktion = 0.400 (Filter 578 mμ)

Testvolumen: 3 cm³

Temperatur: 37°C

Reaktionszeit: 20 Minuten

Da die Einheit auf 25°C bezogen ist, der Test selbst aber bei 37°C erfolgt, muss pro Grad ein Temperaturkoeffizient von 12% zugrunde gelegt werden. Die gemessenen Werte sind also um 144% zu hoch bezogen auf die Messung bei 25°C .

Bezüglich den Normalbedingungen der IUB muss der erhaltene E-Wert. (Differenz der Ablesung zu Beginn und bei Beendigung des Versuches) mit dem Faktor (F) = 46.8, der diesen Wert bei einer Wellenlänge von 366 mμ hat, mutipiziert werden.

$$3.) E_{366} \cdot F = E_{366} \cdot V \cdot t \cdot r \cdot f =$$

$$E_{366} \cdot 3 \cdot \frac{1}{2.44} \cdot 20 \cdot 1.89 =$$

$$E_{366} \cdot 46.8 \left[\frac{\text{Millieinheiten}}{\text{ml}} \right]$$

V = Testvolumen

t = Temperaturkoeffizient r = Reaktionszeit

f = Faktor aus dem Verhältnis der Extinktionskoeffizienten von DPNH bei 340 bzw. 366 mμ, $6.22 \cdot 10^6$ bzw. $3.30 \cdot 10^6 \left[\frac{\text{ccm}}{\text{Mol}} \right]$

- 4.) In dieser Arbeit wurden die Enzymwerte nach Einheiten von Bruns (18) berechnet; dabei muss die "Internationale Enzymeinheit" mit 3.30 multipliziert werden.

Enzymeinheit nach Bruns =

$$E_{366} \cdot 46.8 \cdot 3.3 \left[\frac{\text{Millieinheiten}}{\text{Milliliter}} \right]$$

Die Einheit nach Bruns wird definiert: Eine Einheit ist die Enzymmenge, die bei 37°C in einer Stunde 1 μl FDP pro ml umsetzt. 1 μl FDP/ml = 0.0446 μMol FDP.

D. BESTIMMUNG DES SAUERSTOFFVERBRAUCHS:

Das Problem war, ob eine Relation zwischen Aldolaseaktivität und Sauerstoffverbrauch gefunden werden konnte. Ansatz für den Versuch im Warburgapparat:

- 1.) Veronalpuffer 1.25 ml
- 2.) Glukose (0.1 M) 0.25 ml

- 3.) Physiologische Kochsalzlösung 0.50 ml
- 4.) Bakteriensuspension 0.50 ml
- 5.) Natronlauge (10%-ig) 0.20 ml

zu 1.) 2.062 g Natriumdiäthylbarbiturat ad 100 aquam
dest. (=0.1 M). Von obiger Stammlösung werden
53.6 ml mit 46.4 ml 0.1 n HCl aufgefüllt und der
 p_H auf 6.9 im Messgerät eingestellt.

zu 5.) Die Natronlauge wird in das Zentralgefäß zur Ab-
sorption des entstehenden Kohlendioxys einge-
bracht.

Der Ansatz wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert und der
verbrauchte Sauerstoff berechnet.

E. BESTIMMUNG DES GLUKOSEVERBRAUCHS:

(enzymatisch)

Nach beendetem Warburgversuch wird der Einsatz auf
während der 60 Minuten verbrauchte Glukose untersucht.

Lösungen:

- 1.) Pufferenzymgemisch
 - a.) Phosphatpuffer (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) 0.12 M; $p_H=7$
 - b.) Peroxydase 40 µg/ml
 - c.) Glukoseoxydase 250 µg/ml
- 2.) Chromogen
o-Dianisidinhydrochlorid 6.6 mg/ml
- 3.) Glukose-Standardlösung
Glukose 0.5 M
- 4.) Glukose-Reagenz
100 Teile Pufferenzymgemisch und 1 Teil Chromogen
werden zusammengegeben.
- 5.) Perchlorsäure ca. 0.33 M
2.85 ml 70%-ige Perchlorsäure mit bidestilliertem
Wasser auf 100 ml = 2% verdünnen.

Arbeitsweise:

- 1.) Enteiweissung

Nach Zugabe von 0.3 ml Perchlorsäure in das Reaktions-
gefäß und nach Entnahme des Reaktionsgemisches aus

dem Warburggefäß mittels einer Kapillare wird die Seitenbirne desselben mit bidest. Wasser ausgespült, um eventuelle Glukosereste mitzuerfassen. Der entnommene Inhalt wird auf jeweils 4 ml mit aqua bidest. aufgefüllt, umgeschüttelt und 15 Minuten bei 4000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Der Überstand findet bei der Glukosebestimmung Verwendung.

2.) Bestimmungsansatz

a.) Reagenzien-Leerwert

Bidest. Wasser	0.2 ml
Glukosereagenz	5.0 ml

b.) Glukose-Standardwert

Glukosestandardlösung	0.2 ml
Glukosereagenz	5.0 ml

c.) Probe (Messung der "wahren Glukose"
de* Dekantate)

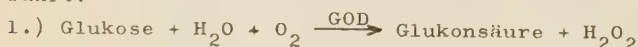
Überstand nach Enteiweissung	0.2 ml
Glukosereagenz	5.0 ml

3.) Glukosebestimmung

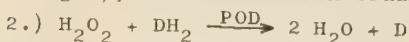
Das Glukosereagenz wird in 30-sec-Abständen in die vorbereiteten Reagenzgläser pipettiert. Diese Zeitabstände sind ebenso beim Messvorgang im Photometer (Filter 436 mμ) einzuhalten, damit alle Proben und der Glukose-Standardwert die gleiche Inkubationszeit von 35 Minuten vor der Messung aufweisen.

Prinzip:

Mit Hilfe des Enzyms Glukoseoxydase (GOD) wird Glukose unter Bildung von Wasserstoffperoxyd in Glukonsäure überführt.



Das Wasserstoffperoxyd oxydiert unter Einwirkung von Peroxydase (POD) den Wasserstoffdonator DH_2 (Chromogen), der dann in den braunen Farbstoff D übergeht.



Die Menge des gebildeten Farbstoffs ist damit äquiva-

lent der umgesetzten Glukosemenge.

Berechnung:

Um den Glukosegehalt pro ml Reaktionsgemisch zu erhalten, bezieht man die Messung auf die Extinktion der Glukose-Standardlösung.

$$\text{Glukosegehalt} = \frac{E_{\text{Probe}} \cdot V_f \cdot G_s \cdot f_1 \cdot f_2}{E_{\text{Standard}}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right]$$

E_{Probe} = Differenz der Extinktion zwischen Reagenzien-Leerwert und Probe

E_{Standard} = Differenz der Extinktion zwischen Reagenzien-Leerwert und Glukose-Standardwert

V_f = Verdünnungsfaktor der Probe

f_1 = Faktor, der den Glukosegehalt der Gesamtprobe ergibt. Nur bei Werten mit Glukose im Ansatz in die Formel einzusetzen.

f_2 = Faktor, um den Wert auf 1 ml des Reaktionsgemisches zu beziehen.

G_s = Glukose des Glukose-Standardwertes pro Reaktionsansatz

$$\text{Glukosegehalt} = \frac{E_{\text{Probe}} \cdot 4 \cdot 18.2 \cdot 20 \cdot 5}{E_{\text{Standard}}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right]$$

F. STATISTIK:

Die statistische Sicherung der Unterschiede wurde mit Hilfe des Signifikans-t-Testes nach Fisher (27) durchgeführt.

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\frac{\sum_1 (x_1 - M_1)^2 + \sum_2 (x_2 - M_2)^2}{N_1 + N_2 - 2} \cdot \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}}$$

M_1, M_2 = Mittelwerte zweier Versuchsreihen

x_1, x_2 = Einzelwerte

$(x_1 - M_1)^2$ = Summe der Quadrate der Einzelabweichungen vom Mittelwert einer Versuchsreihe

N_1, N_2 = Anzahl der Einzelversuche einer Versuchsreihe

$N_1 + N_2 - 2$ = Freiheitsgerade

Der t-Wert des Signifikans-Testes zeigt zusammen mit der Anzahl der Versuche den Grad der Wahrscheinlichkeit, der in Prozenten ausgedrückt wird, an. Als signifikanter Unterschied zwischen zwei Mittelwerten gilt eine Wahrscheinlichkeit von 98% bis 100%. Werte unterhalb von 98% sind nicht signifikant.

IV. ERGEBNISSE

Aus den Versuchen, die die Wachstumsgeschwindigkeit der Neisserien angeben, ist ein Maximum zwischen 9 und 11 Stunden festzustellen, das der Ruhephase im Wachstum der Bakterien entspricht. Die Werte im ansteigenden Teil der Kurve sind zum Höchstwert, der nach 11 Bebrütungsstunden erreicht wird, signifikant, während im abfallenden Teil der Kurve zwischen den Mittelwerten von 11, 12, 13 Stunden keine Signifikanz feststellbar ist (Tab. 3, Abb. 4-6).

Ähnlich dem Wachstum ist der Anstieg zum Höchstwert der Aldolaseaktivität, der bei 10 Stunden Bebrütung gemessen wurde und der 32.1 Einheiten nach Bruns beträgt, signifikant. Die 12, 14, 16 Stundenwerte sind dagegen zum 10 Stundenwert nicht signifikant (Tab. 4, Abb. 7 und 8). 32.1 Einheiten nach Bruns entsprechen einem FDP-Umsatz von 1.422 μMol pro Stunde und pro Milliliter des Ansatzes bei 37°C.

Auf Grund der Streuung in den Einzelversuchen ist bei der enzymatischen Glukosebildung kein gesicherter Unterschied festzustellen (Tab. 5, Abb. 9 und 10). Ausser der 6. und 18. Bebrütungsstunde, wo Glukose umgesetzt wird, wird nach dem Enzymtest, der sich an den Warburgversuch anschloss, Glukose gebildet. Der höchste Wert der Glukosebildung liegt im Durchschnitt bei 10 Stunden.

Die Kurve der Mittelwerte des Sauerstoffverbrauches hat zwei Maxima. Der erste Höchstwert liegt bei 8 Stunden Bebrütung. Das entspricht einem Glukoseumsatz von 0.329 μMol pro Stunde und Milliliter des Ansatzes bei 37°C. Der zweite Höchstwert wurde nach 16 Bebrütungsstunden erreicht, wobei 0.277 μMol Glukose unter den oben angegebenen Bedingungen umgesetzt wurden. Der 8 Stundenwert ist zum 6 und 16 Stundenwert nicht signifikant. Das zweite Maximum bei 16 Bebrütungsstunden zeigt keinen statistisch errechenbaren Unterschied zu den 12, 14 und 18 Stundenwerten.

Die Versuchsreihe X ging nicht in die Mittelwertberechnung und Statistik mit ein, da Wachstum, Aldolaseaktivität und Sauerstoffverbrauch der Neisserien in dieser Versuchsreihe sich grundsätzlich von den übrigen 11 Versuchsreihen unterschieden.

Abb.3: Eichkurve (Siehe auch Tab.1 und Abb.1 und 2). Es wird bei jeweils gleicher Bebrütungszeit die im Photometer Eppendorf (Filter 578 m μ) gemessene Dichte der Neisserien mit den auf sterilen Nährböden gewachsenen Bakterienkolonien in Zusammenhang gebracht.

Abszisse: Gezählte Bakterienkolonien multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor.

Ordinate: Neph. 578 m μ = Mit Filter 578 m μ im Photometer Eppendorf gemessene Werte.

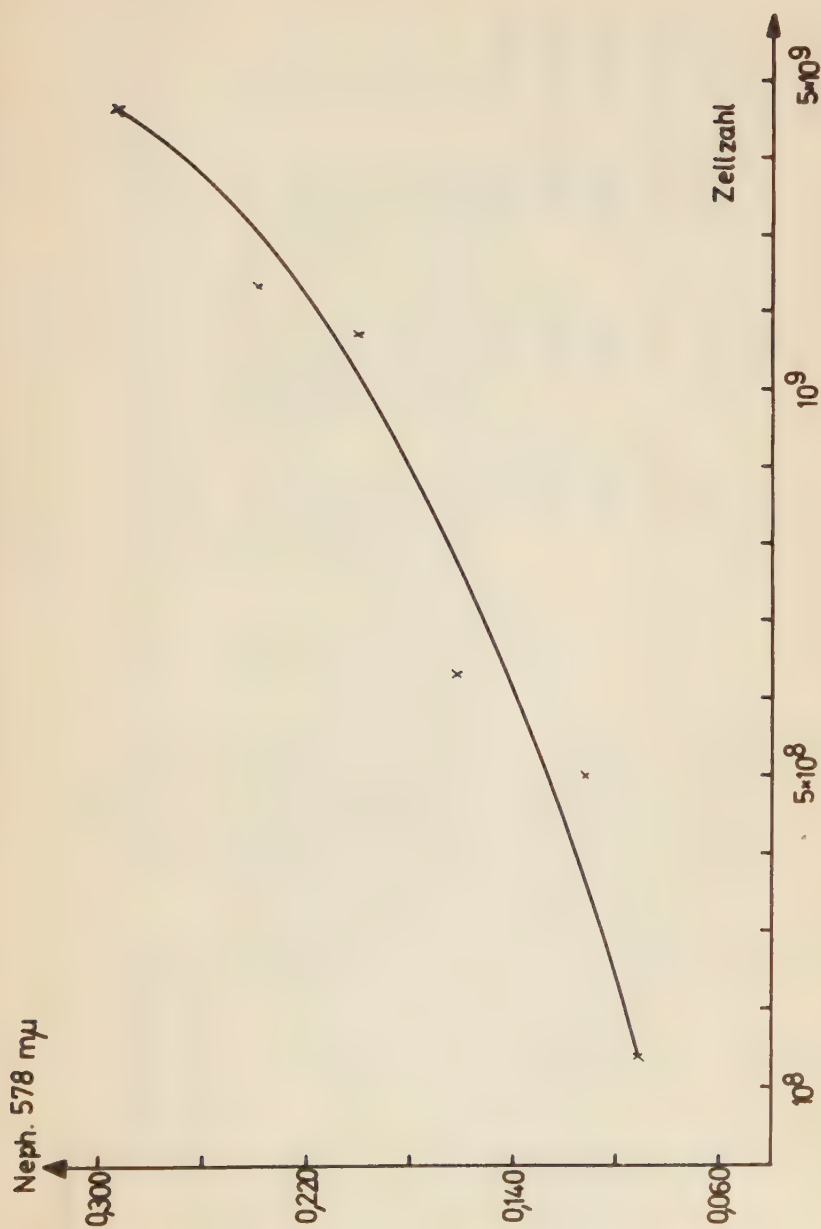


Abb. 3

Tab.2: Werte zur Ermittlung der Wachstumskurve der Neis-
serien, die in 12 Versuchsreihen bei verschiedenen
Bebrütungszeiten (Angaben in Stunden) im Photometer
Eppendorf, Filter 578 m μ gefunden wurden.

— = Ausgefallene Versuche.

Tab. 2

Bebrütungszeit	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	20
Versuchsreihe														
I	0,005	0,024	0,082	0,154	0,252	0,270	0,315	0,292	0,277	0,256	0,183			
II	0,008	0,022	0,103	0,197	0,254	0,292	0,322	0,298	0,288	0,280	0,260			
III			0,054	0,128	0,217	0,262	0,247	0,236	0,225	0,180	0,140			
IV			0,107	0,156	0,204	0,295	0,279	0,260	0,225	0,210	0,190			
V			0,128	0,180	0,215	0,235	0,270	0,279	0,246	0,170	0,170			
VI						0,297			0,185		0,156	0,132	0,103	0,080
VII						0,250			0,230		0,150	0,065	0,043	
VIII						0,275			0,215		0,185	0,105	0,025	
IX						0,280			0,204		0,165	0,125	0,120	
X						0,150			0,147		0,182	0,290	0,315	0,210
XI						0,179			0,063		—	0,036	—	
XII						0,252			0,154		0,149	0,120	0,048	
Mittelwert	0,007	0,023	0,095	0,163	0,228	0,271	0,270	0,273	0,210	0,219	0,175	0,097	0,068	0,080

Abb.4: Wachstumskurve der Neisseries. Es sind die Mittelwerte aus 12 Reihenversuchen dargestellt (Siehe Tab.2).

Abszisse: Bebrütungszeit in Stunden.

Ordinate: Mit Filter 578 m μ im Photometer Eppendorf gemessene Extinktionsgrade.

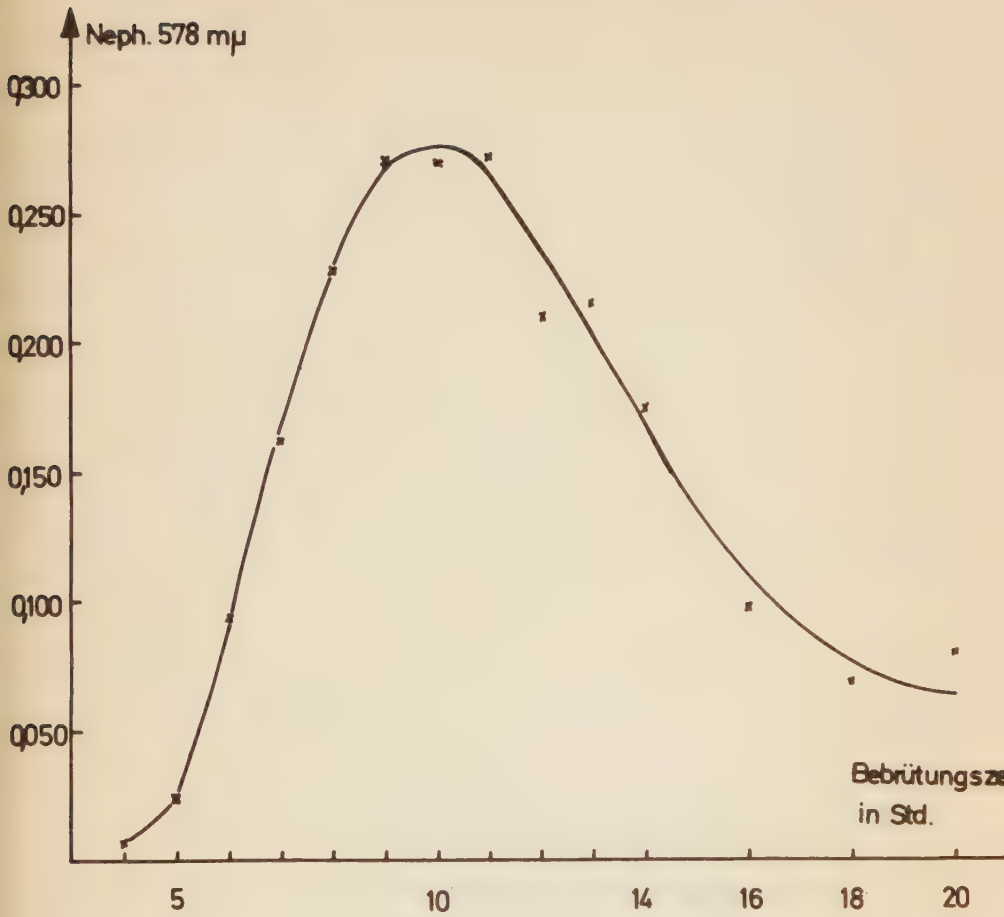


Abb.4

Abb.5: I.-V. Versuchsreihe zur Bestimmung der Wachstums-
kurve der Neisserien.

Abszisse: Bebrütungszeit in Stunden.

Ordinate: Mit Filter 578 m μ im Photometer Eppen-
dorf gemessene Werte.

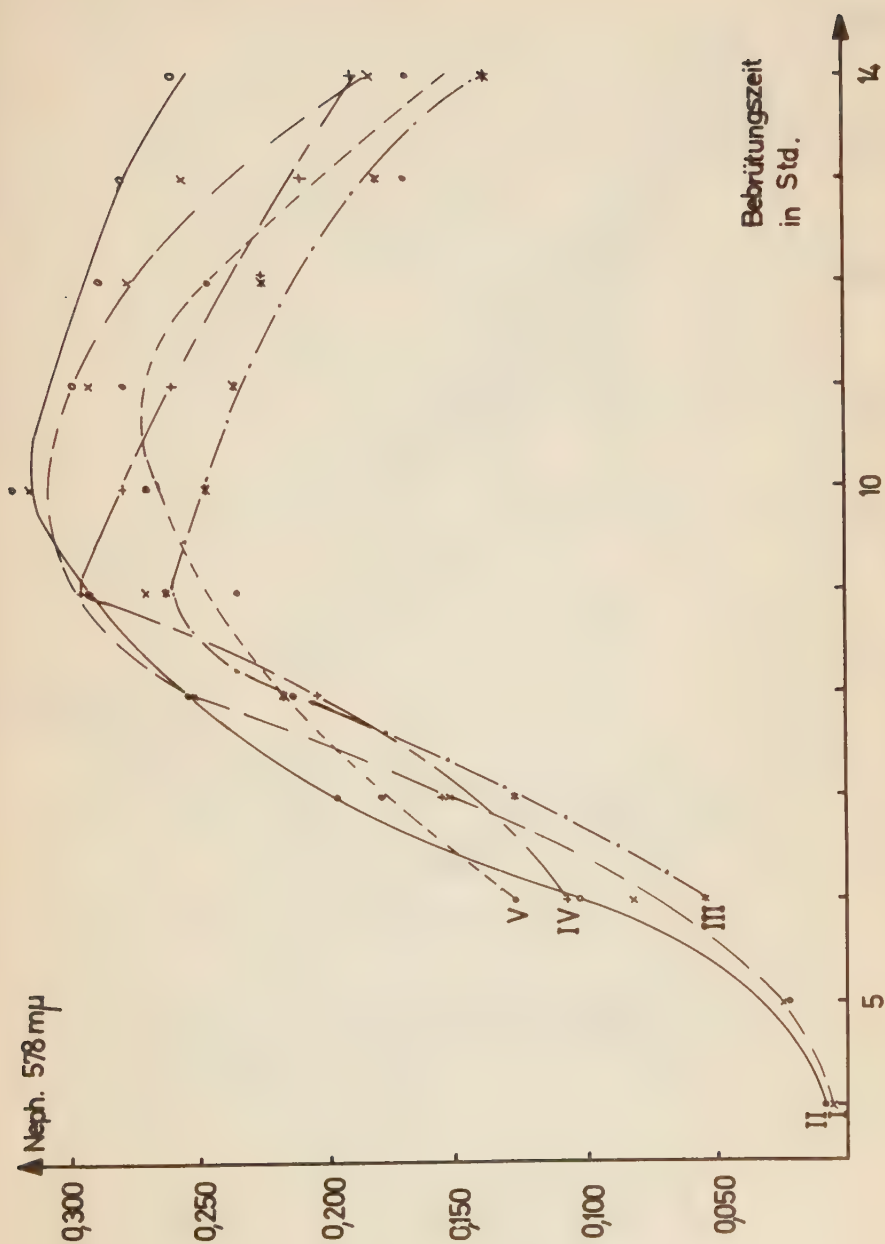


Abb. 5

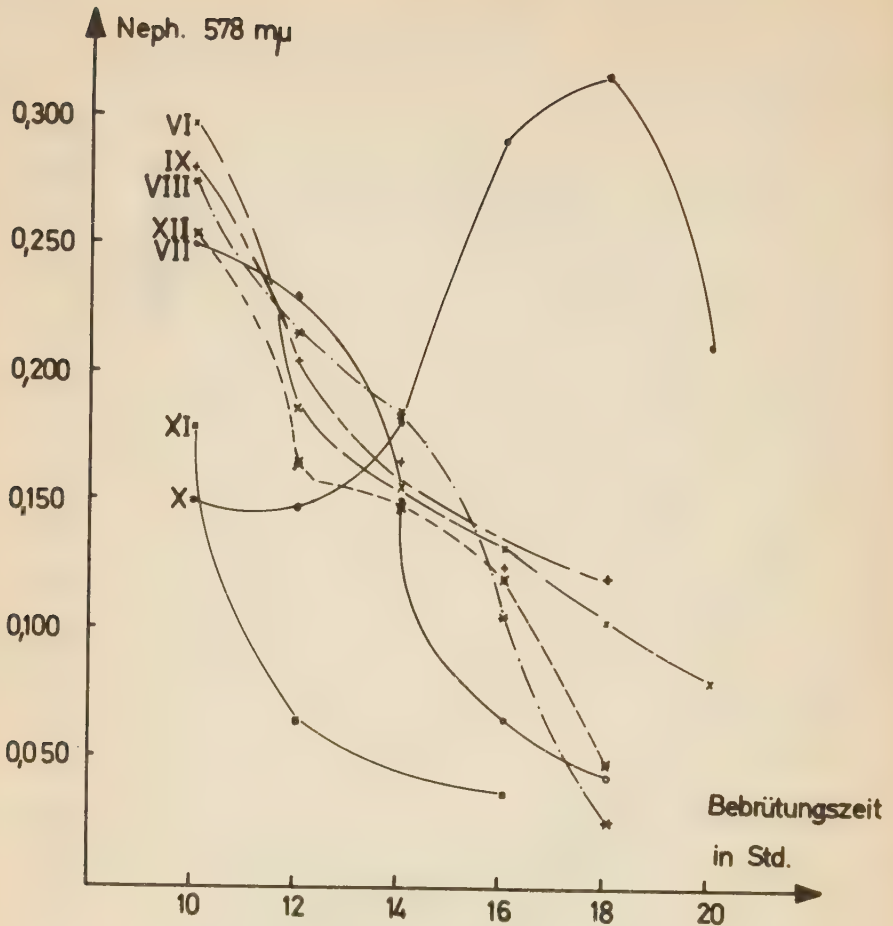


Abb. 6

VI.-XII. Versuchsreihe zur Bestimmung der Wachstumskurve der Neisserien.

Abszisse: Bebrütungszeit in Stunden.

Ordinate: Mit Filter 578 mμ im Photometer Eppendorf gemessene Werte.

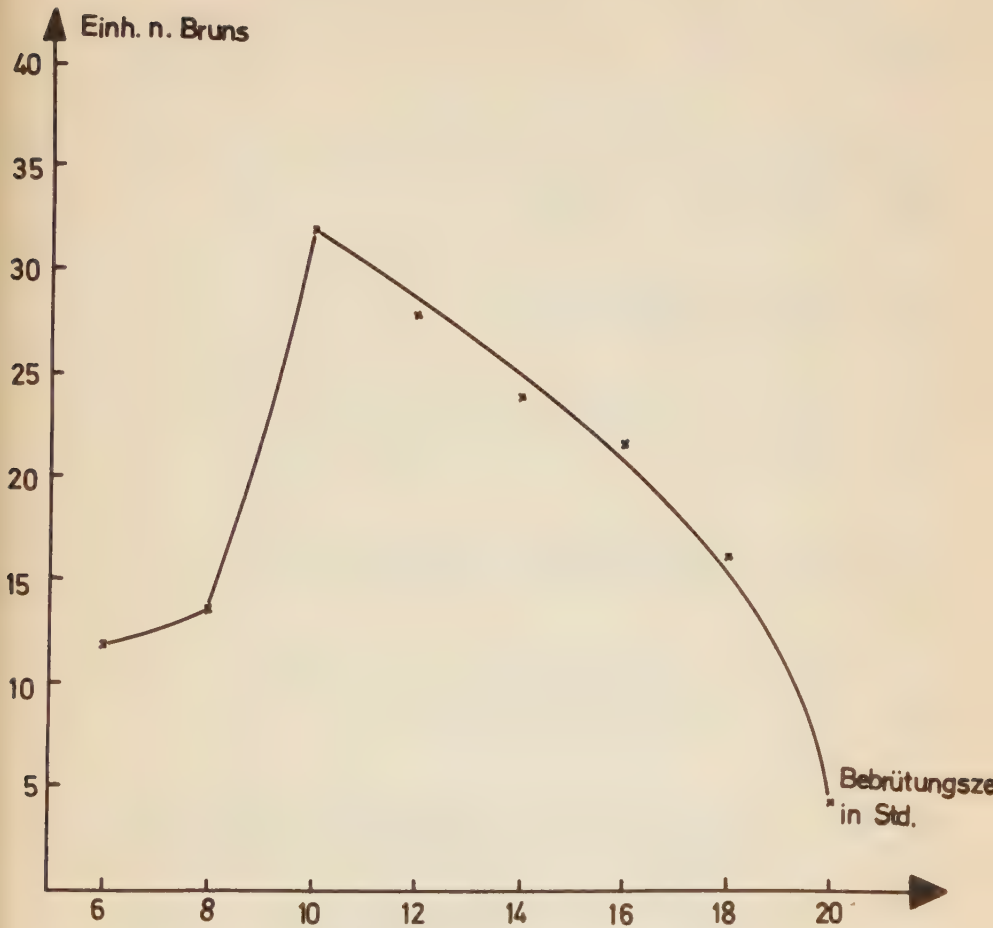


Abb. 7

Mittelwertskurve der Aldolaseaktivität der Neisserien, die sich aus 12 Reihenversuchen errechnet. Siehe auch Tab. 3.

Abszisse: Bebrütungszeit in Stunden.

Ordinate: Einheiten nach Bruns.

Tab.3: In 12 Versuchsreihen wurden bei verschiedenen Bebrütungszeiten (Angaben in Stunden) die Einheiten nach Bruns zur Ermittlung der Aldolaseaktivität der Neisserien errechnet, nachdem im Photometer Eppendorf die Extinktionsgrade gemessen worden waren.

 = Ausgefallene Versuche.

Tab. 3

Bebrütungszeit	6	8	10	12	14	16	18	20
Versuchsreihe								
I	10,4	12,6	22,3	21,2	11,0			
II	10,1	11,9	18,9	16,6	15,0			
III	13,9	13,8	24,2	23,4	18,3			
IV	13,0	15,3	26,1	30,9	21,9			
V	12,9	15,0	25,6	26,5	15,0			
VI			38,0	34,0	23,0	4,8	7,0	4,3
VII			41,5	33,0	45,0	31,5	14,5	
VIII			54,5	37,0	23,5	30,0	24,0	
IX			32,5	28,5	40,5	27,5	18,5	
X			20,0	20,0	14,0	18,5	18,0	21,5
XI			32,0	21,0	—	12,0	—	
XII			37,5	35,5	27,5	25,0	17,5	
Mittelwert	12,1	13,7	32,1	28,0	24,1	21,8	16,3	4,3
umgerechnet in $\mu\text{Mol FDP}$	0,540	0,611	1,432	1,249	1,075	0,972	0,727	0,192

Abb.8: Reihenversuche I-XII zur Bestimmung der Aldolaseaktivität der Neisserien (Siehe Tab.3).

Abszisse: Bebrütungszeit in Stunden.

Ordinate: Einheiten nach Bruns.

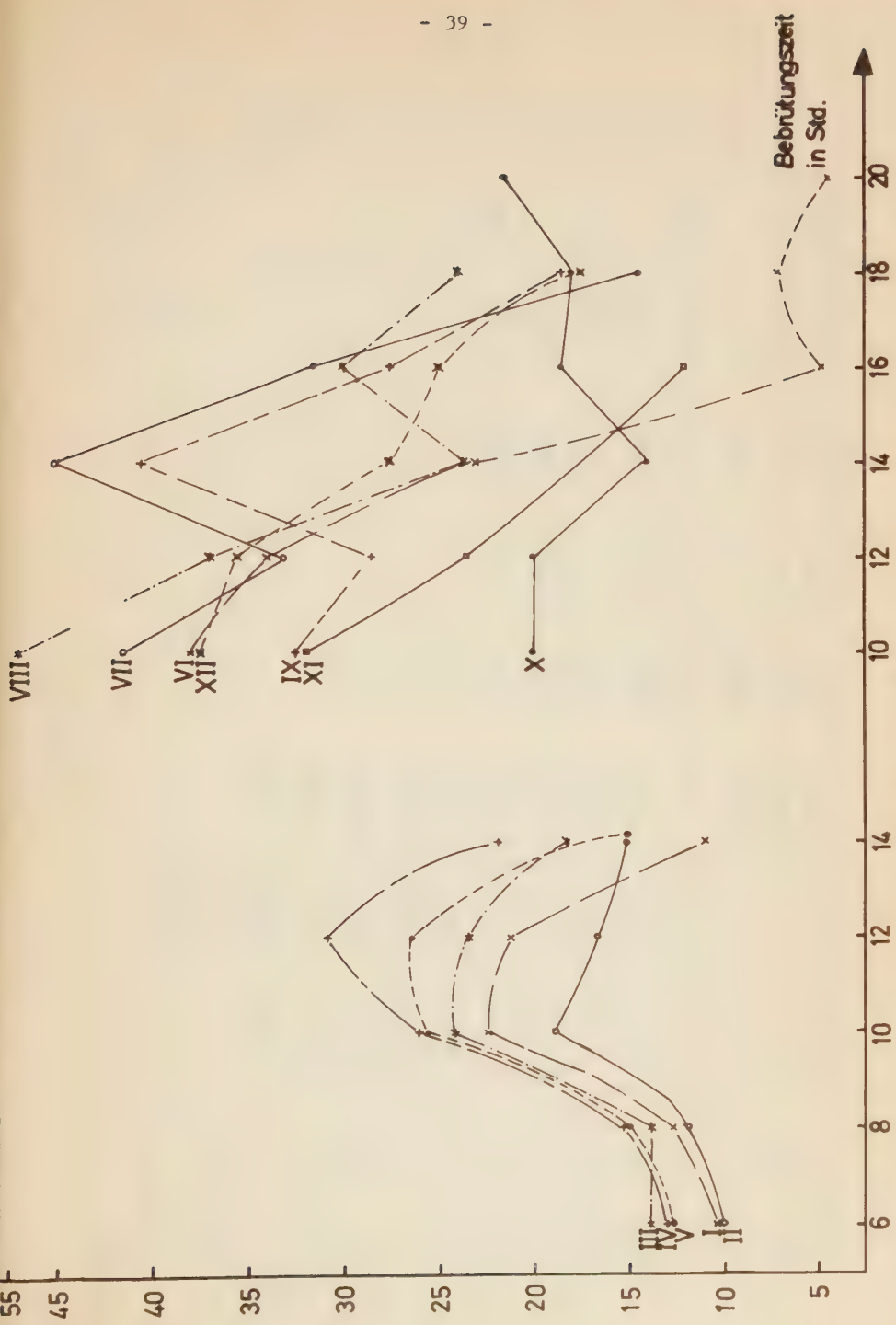


Abb. 8

Tab.4: Im Warburgversuch umgesetzte (-) oder gebildete (+) Glukose durch die Neisserien, die sich aus den im Photometer Eppendorf, Filter 436 m μ , abgelesenen Extinktionsgraden im enzymatischen Test ergab. Angaben in μ g.

— = Ausgefallene Versuche.

Tab. 4

Bebrütungszeit	6	8	10	12	14	16	18	20
Versuchsreihe								
I	-225,3	+107,6	+106,1					
II	+210,1	-25,7	+846,8					
III	+890	+228,2	+864,8					
IV	-204,2	-509	+333,4					
V	-37,7	-131,5	+90,2					
VI			+111,19	+31,6	+132,8	+1464,7	+1490	+557,6
VII			+45398	+337,0	+2390	+2299	+1386	
VIII			-5787	-335,79	+702,1	+4770	-509,16	
IX			-74195	-325,25	-531,35	-83853	-498,53	
X			-334,5	-577,85	-801	+10	+218,75	+212,07
XI			+667,44	+796,25	—	+1934	—	
XII			-170,77	+154,15	+574	+1027	+4706	
Mittelwert	-33,6	+25,5	+162,5	+109,6	+1200	+512	-49,9	+557,6

Abb.9: Kurve der sich aus 12 Reihenversuchen ergebenden Mittelwerte der Glukosebildung oder des Glukoseumsatzes während des Warburgversuches durch die Neisserien. Gemessen wurde mit Filter 436 m μ im Photometer Eppendorf. Siehe auch Tab.4.

Abszisse: Bebrütungszeit in Stunden.

Ordinate: Glukosewerte in μ g. + = Gebildete Glukose; - = Umgesetzte Glukose.

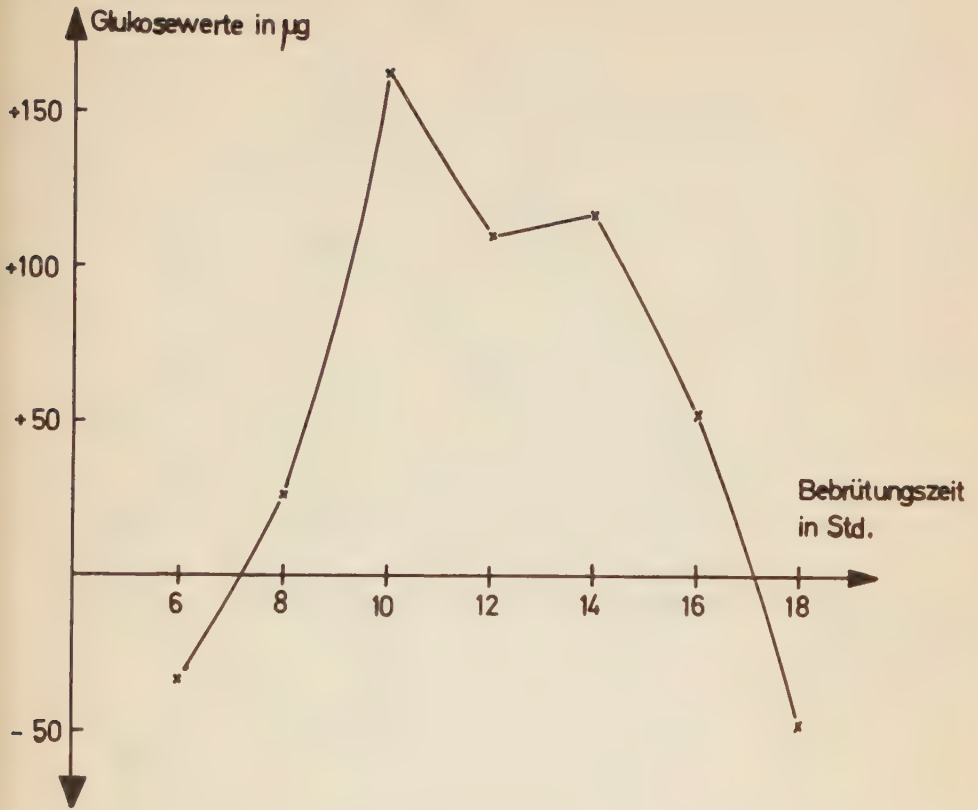


Abb. 9

Abb.10: Reihenversuche I-XII zur Abb.9 (Siehe auch Tab.4).

Abszisse: Bebrütungsstunden.

Ordinate: Glukosewerte in μg . + = Gebildete Glukose;
- = Umgesetzte Glukose.

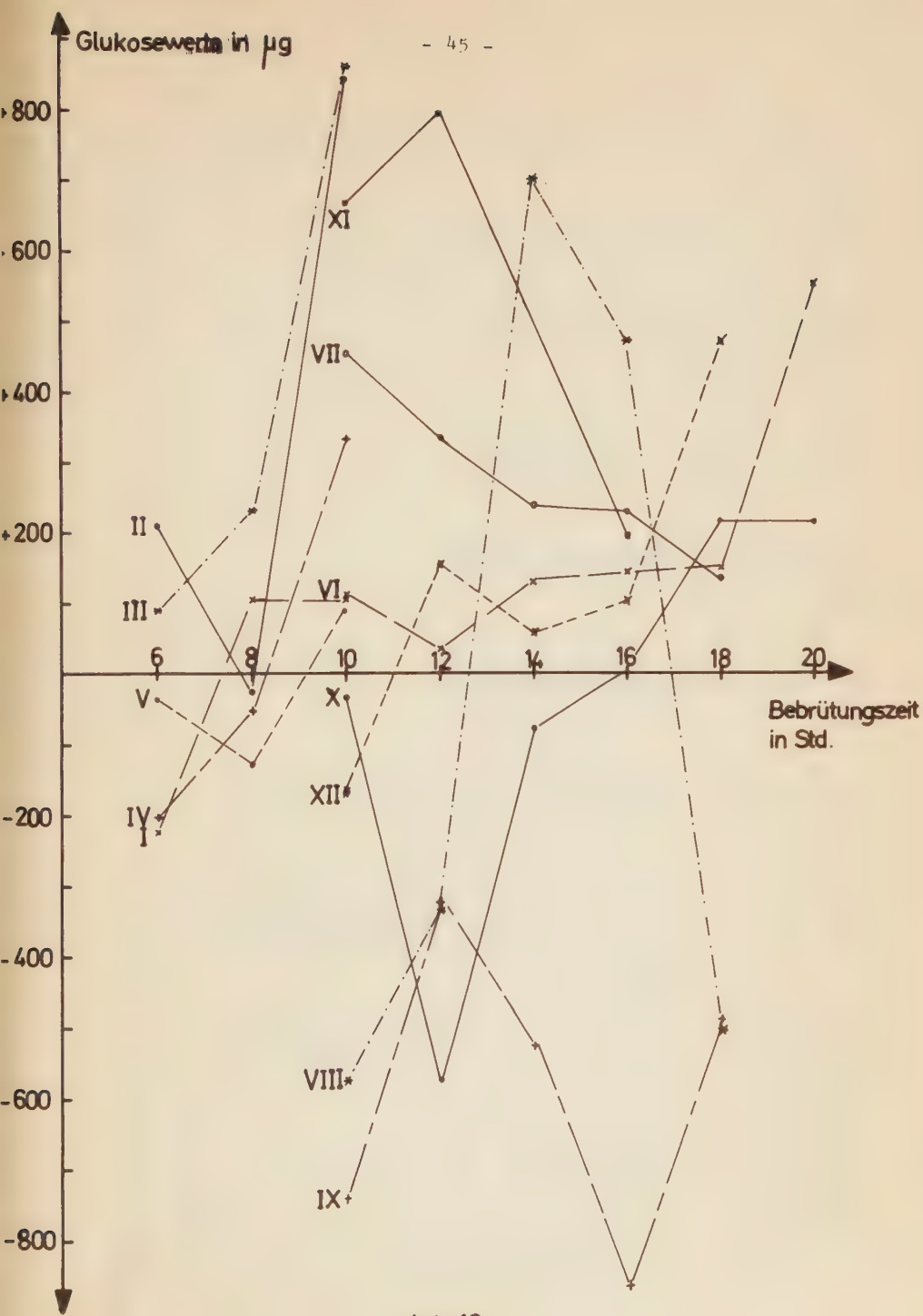


Abb. 10

Tab.5: Durch die Neisserien im Warburgversuch verbrauchter Sauerstoff. Die Mittelwerte, die in μ l angegeben sind, wurden in μ Mol der ungesetzten Glukose umgerechnet.

= Ausgefallene Versuche.

Tab. 5

Bebrütungszeit	6	8	10	12	14	16	18	20
Versuchsreihe								
I	-18,8	-25,4	-17,2					
II	-26,8	-24,8	-10,8					
III	-16,2	-17,4	-23,2					
IV	-16,0	-34,2	-13,6					
V	-32,8	-17,4	-9,0					
VI			-1,4	-12,8	+0,4	-2,6	-4,8	-1,4
VII			-2,6	-4,8	-2,2	-5,2	-14,6	
VIII			-6,4	-1,4	-5,0	+0,4	-2,8	
IX			-4,0	-5,0	-20,8	-4,62	-4,6	
X			-3,0	-26,8	-24,8	0	-9,6	-0,4
XI			-7,8	-2,4	—	-26,6	—	
XII			-5,0	-2,4	-9,4	-2,6	+2,0	
Mittelwert μO_2	-22,1	-23,8	-9,2	-4,8	-7,4	-13,8	-5,1	-1,4
umgerechnet in $\mu\text{Mol Glukose}$	0,329	0,354	0,138	0,071	0,110	0,208	0,076	0,021

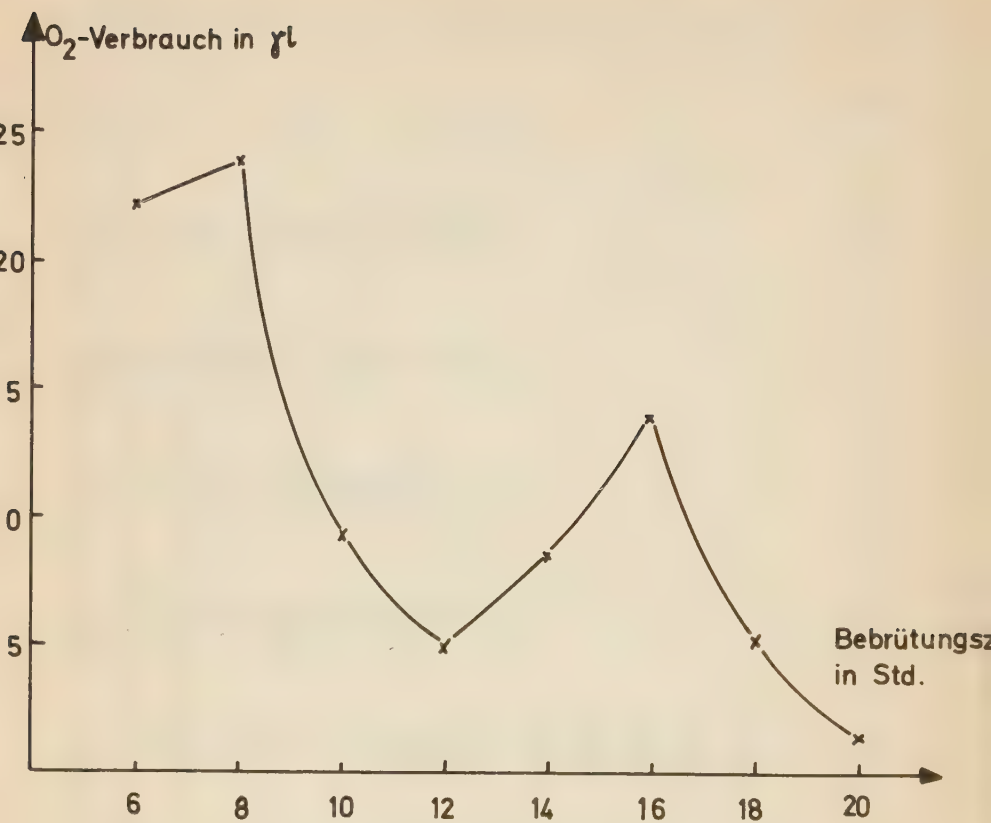


Abb. 11

Mittelwertskurve des Sauerstoffverbrauchs durch die Neisserien im Warburgversuch.

Abszisse: Bebrütungsstunden.

Ordinate: Sauerstoffverbrauch in γl.

V. DISKUSSION

Der Verlauf der Wachstumskurve der Neisserien (Abb.4) zeigt, dass die Latenzzeit bis zur vierten Bebrütungsstunde andauert. Die sich anschliessende logarithmische Wachstumsphase liegt zwischen 5 und 9 Stunden. Die kurze Spanne der Ruhephase stellt sich zwischen 9 und 11 Stunden dar. Die Absterbephase wurde bis zur 20. Bebrütungsstunde verfolgt.

Vergleicht man das Wachstum mit der Aldolaseaktivität der Neisserien (Abb.12), so fällt der weitgehend parallele Verlauf beider Kurven auf. Die Aldolaseaktivität war gegenüber der Hexokinaseaktivität der Neisserien, die Oelschläger (64) untersuchte, um ein Vielfaches höher, was wohl auf die grössere Bakteriendichte bei den Versuchen dieser Arbeit zurückzuführen ist. Der Sauerstoffverbrauch, der im Warburgapparat gemessen wurde und der einen Hinweis auf die Menge der auf oxydativem Wege abgebauten Glukose gibt, hat bei 8 und 16 Stunden Bebrütungszeit seine Höchstwerte (Abb.11). Der höchste Glukoseumsatz des von uns untersuchten Neisserienstammes betrug nur 0.354 μ Mol. Grössenordnungsmässig ist das lediglich ein Viertel der gemessenen FDP-Spaltung, d.h. der Aldolaseaktivität. Hieraus kann man schliessen, dass weder der Embden-Meyerhof-Weg, noch der Pentoseshunt über besonders aktive Enzymsysteme verfügt, da zwei seiner wichtigsten Fermente ausserordentlich wenig wirksam sind. Das erklärt hinreichend, warum Neisserien Glukose als Energielieferanten nicht oder nur in untergeordnetem Masse verwenden können.

Nach Oelschläger (64) lag der Glukoseverbrauch 40 mal höher, als der gemessenen Hexokinaseaktivität entsprach. Der von uns gemessene Glukoseverbrauch betrug nur ein Viertel des von Oelschläger bestimmten Umsatzes.

Berger (6) stellt in seinen Untersuchungen bei anaeroben Bedingungen an Neisserien eine geringe Glykolyse von Monosacchariden, besonders von Glukose, fest. 44% der von ihm untersuchten Stämme vergoren Glukose nur schwach, 21% über-

Abb.12: Vergleich des Wachstums der Neisserien mit deren Aldolaseaktivität bei verschiedenen Bebrütungszeiten.

Abszisse: Bebrütungsstunden.

Ordinaten: Einheiten nach Bruns = $\bullet - - - \bullet$.

Neph. 578 $m\mu$ = Mit Filter 578 $m\mu$ im
Photometer Eppendorf gemessene Extink-
tionsgrade = $\longleftrightarrow$.

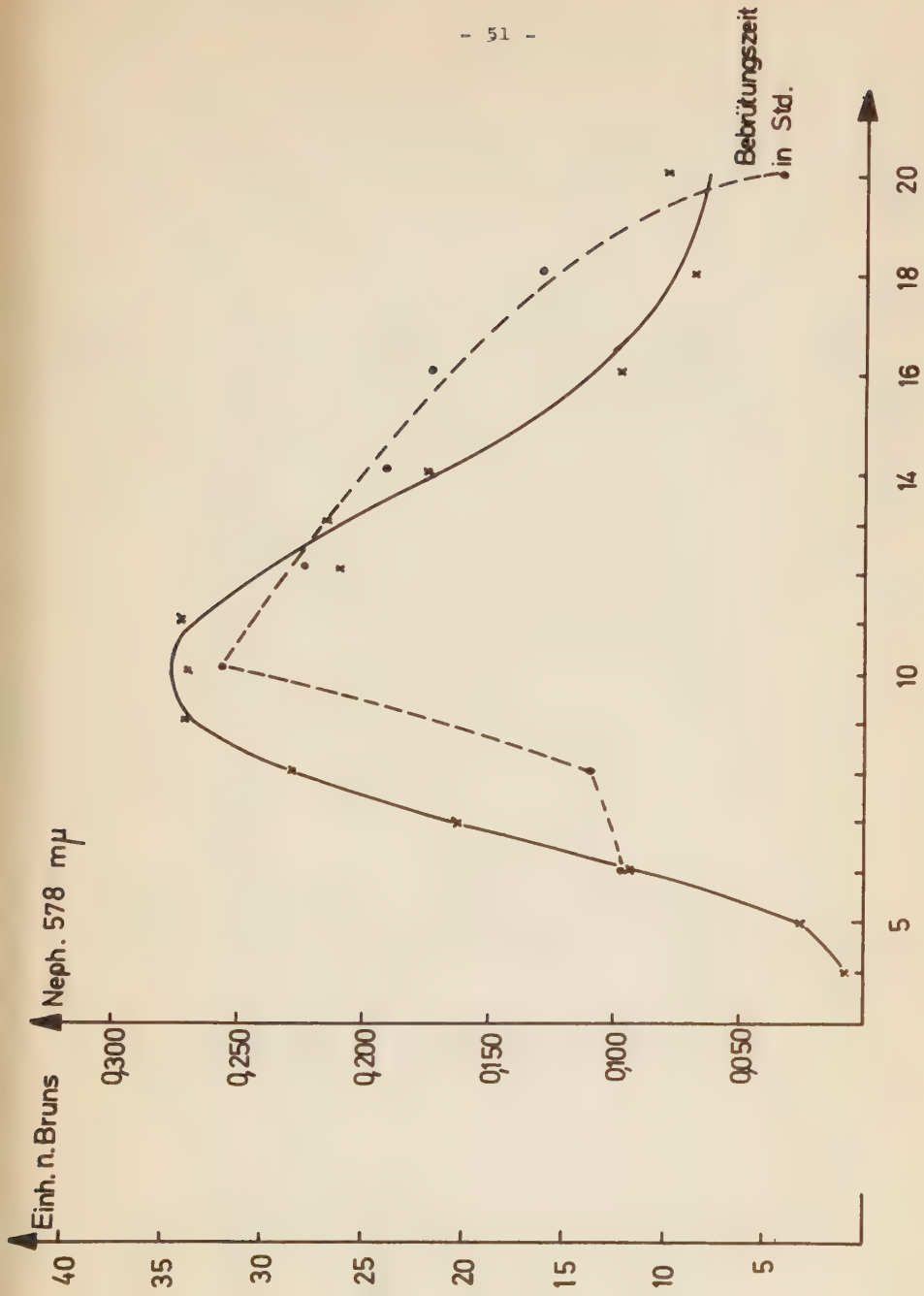


Abb. 12

Abb.13: Vergleich der Bildung bzw. des Umsatzes der Glukose mit dem Sauerstoffverbrauch durch die Neis-serien.

Abszisse: Bebrütungsstunden.

Ordinaten: Sauerstoffverbrauch in $\text{gl} = \text{-----}$.

Glukosewerte in $\mu\text{g} = \text{-----}$.

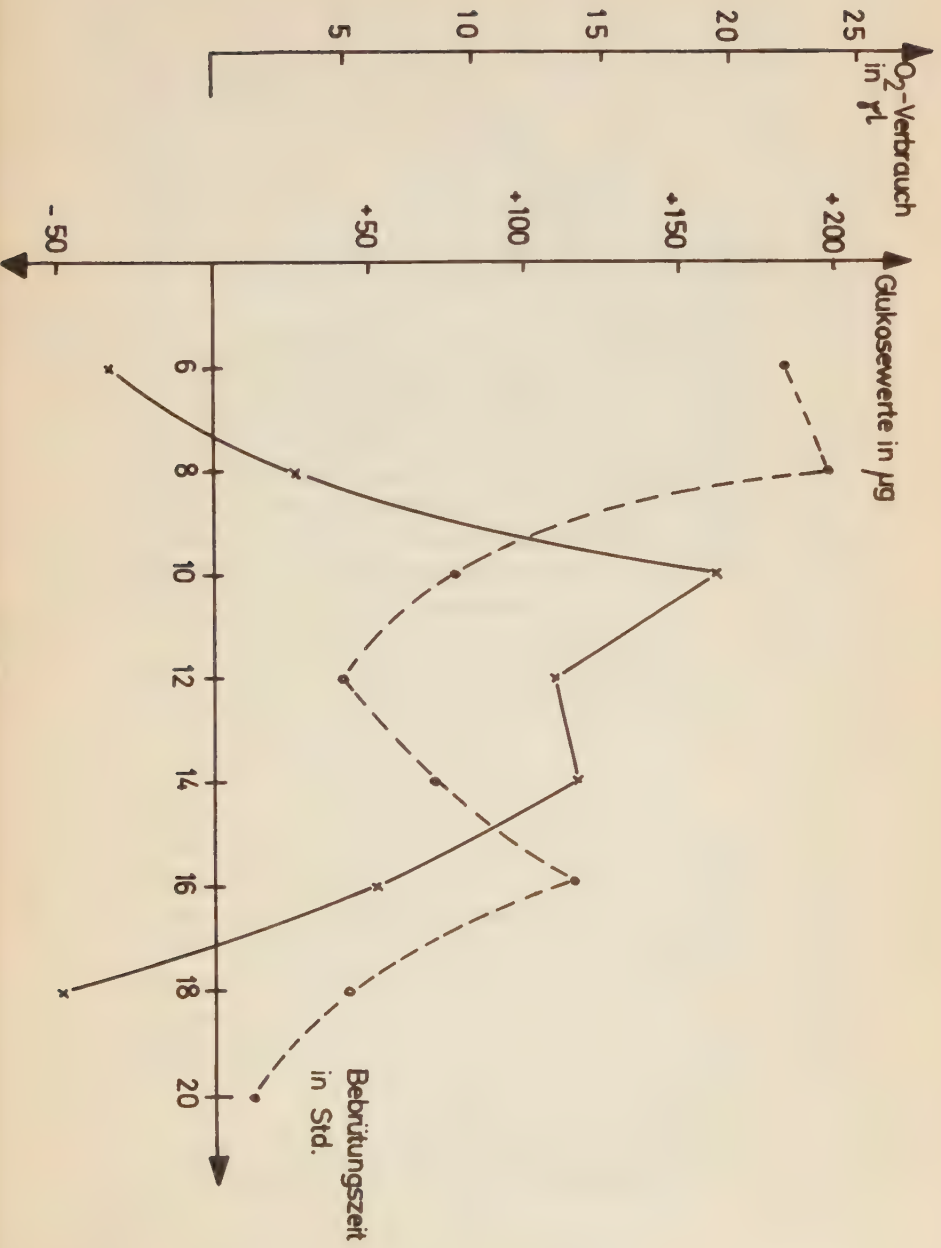


Abb. 13

haupt nicht. Obwohl die Neisserien als Aerobier die Glukose bevorzugt verbrennen, ist doch ein Vergleich der schlechten Glykolyse, die Berger beobachtete, mit den niedrigen Werten des oxydativen Glukoseabbaues der vorliegenden Arbeit möglich, da beide Abbauege die gleichen Enzymsysteme benötigen und nur die reduzierten Coenzyme auf verschiedenen Wegen wieder oxydieren. Die Brenztraubensäure wird bei der Glykolyse zu Milchsäure reduziert, während sie beim aeroben Abbau in den Krebszyklus eingeschleust wird. Die Neisserien zeigen sowohl eine schwache Vergärung wie Verbrennung der Glukose.

Dagegen verwerten 61% der von Berger (6) untersuchten Neisserien Fruktose zu 96%, während 39% der Stämme Fruktose nur schwach umsetzen. Berger (7) sieht in der Verwertung von Disacchariden, wie z.B. Saccharose, Maltose und Laktose, die immer zu beobachten ist, wie in der fehlenden Verwertung von Monosacchariden ein charakteristisches Merkmal der Neisserien. Die minimale Hexokinaseaktivität, die eine ausreichende Phosphorylierung der Monosaccharide praktisch ausschliesst, erklärt den ungenügenden Umsatz dieser Zucker. Disaccharide können direkt durch Phosphorolyse in die phosphorylierten Monosaccharide gespalten werden, so dass dies eine Möglichkeit der Erklärung für die bessere Disaccharidverwertung durch die Neisserien sein könnte (7).

Es kann aber aus den Versuchsreihen I-V bei Bebrütungszeiten von 6, 8, 10 Stunden ersehen werden, dass zum Teil in erheblichen Masse Glukose im Überstand zunimmt (Abb. 10). Diese Glukosezunahme könnte z.B. durch Spaltung von Reservekohlenhydraten der Bakterienzellen und durch ihren Durchtritt in das Aussenmedium erklärt werden. Auf die Fähigkeit der Neisserien zur Polysaccharidbildung wurde in der Einleitung hingewiesen. Ein Vergleich des O_2 -Verbrauchs mit dem Glukoseumsatz lässt deutlich erkennen, dass bis zur 10. Bebrütungsstunde der Sauerstoffverbrauch umso geringer ist, je grösser die Glukosebildung ist (Abb. 13).

Auf Grund dieser Arbeit muss ein sehr geringer aerober Abbau von Glukose angenommen werden. Die Aldolaseaktivität

war gegenüber der bei Oelschläger (64) festgestellten Hexokinaseaktivität um das 45 fache erhöht. Fruktose-1,6-Diphosphat wurde um ein Mehrfaches im Gegensatz zu Glukose von den Neisserien verwertet. Berger (8) stellte bei den Neisserien die Fähigkeit der Metabolisierung organischer Säuren fest, die aus dem Stoffwechsel der Streptokokken stammen.

Die Plaques-Neisserien verwerten Monosaccharide nicht, benutzen aber Disaccharide zur Bildung extracellulär gelegener Polysaccharide (42,43). So wird die Plaquesbildung vorbereitet. Die Monosaccharide und die nicht abgebauten Disaccharide stehen den Streptokokken als Substrat für die Säurebildung und die Polysaccharidsynthese zur Verfügung, wobei die von den Streptokokken gebildeten organischen Säuren wiederum den Neisserien als Substrat dienen (8). Die an der Plaquesoberfläche lebenden Neisserien verzehren den mit dem Speichel angebotenen Sauerstoff und tragen somit zur Schaffung eines anaeroben Milieus für die Streptokokken bei, so dass in dieser Weise eine Art Symbiose zustandekommt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei verschiedenen Bebrütungszeiten wurden das Wachstum, die Aldolaseaktivität und der Glukoseumsatz, sowie der Sauerstoffverbrauch an Neisserien untersucht, die aus menschlichen Plaques isoliert worden waren.
2. Das stärkste Wachstum der Neisserien wurde nach 10 Stunden Bebrütung gemessen. In derselben Zeit war das Maximum der Aldolaseaktivität und des Glukoseumsatzes erreicht.
3. Der Sauerstoffverbrauch hatte seinen Höchstwert nach 8 Stunden Bebrütung und nach einem anschliessenden Abfall einen zweiten Anstieg bei 16 Stunden Bebrütung.
4. Der maximale Glukoseumsatz betrug ein Viertel des maximalen Wertes der Aldolaseaktivität.
5. Die Folgerungen aus einem geringen Glukoseumsatz werden diskutiert und auf eine mögliche Symbiose zwischen Streptokokken und Neisserien in den Plaques hingewiesen.

Am Ende dieser Arbeit will ich Herrn Professor Dr. F. Bramstedt für die Überlassung des Themas, für die Hilfe bei der Bearbeitung und für die Übernahme des Referates dieser Dissertation meinen besonderen Dank aussprechen.

Herrn Professor Dr. R. Naujoks danke ich für das Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. F. Gehring und Herrn Dr. H.D. Mierau für ihre Unterstützung danken.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) AFONSKY, D.: Some observations on dental caries in Central China. J.dent.Res.30, 53-61, 1951.
- 2.) ALEXANDER, E.: Caries frequency and nutrition before, during and after World War II. Acta odont.scand.8, 269-300, 1950, zit. nach 17.
- 3.) BATES, J.F.: Effect of ingested carbohydrates on the concentrations of amylase, orthophosphates and carbon dioxide in human parotid saliva. J.dent.Res.37, 755-756, 1958.
- 4.) BAUME, L.J.: Ernährungs- und Zahnverhältnisse bei 12000 Kindern in Polynesien. Dtsch. Zahnärztl.Z.20, 509-513, 1965.
- 5.) BERGAIN, O. und Lack of correlation between dental
BERNFIELD, W.F.: caries and salivary amylase. J.dent. Res.24, 141-142, 1945.
- 6.) BERGER, U.: Zur Verwertung von Monosacchariden durch saprophytische Neisserien. Arch.Hyg.(Berl.)145, 190-195, 1961.
- 7.) BERGER, U.: Zur Variabilität der Zuckervergä-
rungen durch Neisserien. Arch.Hyg. (Berl.)145, 296-301, 1961.
- 8.) BERGER, U.: Die anspruchslosen Neisserien. Ergebn.Mikrobiol.36, 97-167, 1963.
- 9.) BERGER, U. und Die Mundflora in Einführung in die
HUMMEL, K.: Mikrobiologie und Immunologie. Verlag Urban und Schwarzenberg, München-Berlin, 1964.

- 10.) BIBBY, B.G. und Acid production by oral Streptococci
van KESTEREN, M.: and Lactobacilli. J.dent.Res.18, 266-
267, 1939.
- 11.) BRAMSTEDT, F und Biochemische Speicheluntersuchungen,
VONDERLINN, R.: II. Die Sauerstoffaufnahme des Spei-
chels und ihre Beziehung zur Zahn-
karies. Zahnärztl.Welt7, 505-509, 1952.
- 12.) BRAMSTEDT, F., Biochemische Speicheluntersuchungen,
KRÖNCKE, A., VI. Die Verbrennung organischer Sub-
NAUJOKS, R. und strate im Speichel KA- und KR-Perso-
VONDERLINN, R.: nen. Dtsch.Zahnärztl.Z.2, 782-791, 1954.
- 13.) BRAMSTEDT, F., Beziehungen zwischen der Aldolaseakti-
NAUJOKS, R. und vität des Speichels und der Karies.
RANKE, E.: Naturwissenschaften47, 187, 1960.
- 14.) BRAMSTEDT, F., Oral sugar clearance und Fermentakti-
NAUJOKS, R. und vitäten im menschlichen Speichel.
HENEDICT, C.: Dtsch.Zahnärztl.Z.18, 242-249, 1963.
- 15.) BRAMSTEDT, F.: Neuere Untersuchungen über die Be-
deutung der Kohlenhydrate in der
Kariesätiologie. Dtsch.Zahnärztl.Z.
20, 505-509, 1965.
- 16.) BRINER, W.W. und The effect of enamel fluoride on
FRANCIS, M.D.: acid production by Lactobacillus
casei. Arch.oral Biol.7, 541-550, 1962.
- 17.) BRISLIN, J.F. und Survey of the literature of dental
COX, G.J.: caries, 1948-1960. University of
Pittsbourgh Press, 1964.
- 18.) BRUNS, F.: Bestimmung und Eigenschaften der Se-
rumaldolase. Biochem.Z.325, 156-
162, 1954.
- 19.) BURNETT, G.W.: The respiration rate of human saliva.
J.dent.Res.31, 468-469, 1952.

- 20.) CALANDRA, J.C. Oxydation of glucose degradation
und ADAMS Jr., E.C.: products in the presence of sali-
va and possible relation to cari-
es immunity. J.dent.Res.30, 229-
234, 1951.
- 21.) CLEMENT, A.J., The formation of lactic acid in
PLOTKIN, R. und dental plaques. J.dent.Res.35,
FOSDICK, L.S.: 786-796, 1956.
- 22.) CONSTANT, M.A., Dental caries in the cotton rat.
PHILLIPS, P.H. und XII. Natural versus refined su-
ELVEHJEM, C.A.: gars. J.Nutr.43, 551-564, 1951.
- 23.) DOBKOWSKY, T.: Vergleichende Kariesuntersuchun-
gen in Ekuador. Stoma(Heidelb.)
2, 221-235, 1949.
- 24.) DRIAK, F.: Beitrag zum phylogenetischen Al-
ter der Zahnkaries. Wien.klin.
Wschr.62, 75-78, 1950.
- 25.) EGGERS LURA, H.: Mikrogasometric estimation of the
salivary gases. J.dent.Res.32,
697-698, 1953.
- 26.) EGGERS LURA, H.: Untersuchungen über den aeroben
und anaeroben Abbau der Kohlen-
hydrate im Speichel. Dtsch.Zahn-,
Mund-u.Kieferhik,21, 97-111, 1954.
- 27.) FISHER, R.A.: In Hodgman, C.D., Weast, R.C., Shauk-
land, R.S. and Selby, S.M.: Hand-
book for chemistry and physics.
The Chemical Rubber Publishing
Co., Cleveland, Ohio, 1963.
- 28.) FREMLIN, J.H. und A microchromatographic study of
MATHIESON, J.: the penetration of enamel by C¹⁴-
labelled glucose. Arch.oral Biol.
4, 92-96, 1961.

- 29.) GIBBONS, R.J. und Synthesis of extracellular dextran
BANGHART, S.B.: by cariogenic bacteria and its pre-
sence in human dental plaque. Arch.
oral Biol. 12, 11-24, 1967.
- 30.) GIBBONS, R.J. und Intracellular polysaccharide storage
SOCRANSKY, S.S.: by organisms in dental plaques.
Arch. oral Biol. 7, 73-80, 1962.
- 31.) GIBBONS, R.J. und Synthesis of intracellular iodophi-
KAPSIMALIS, B.: lic polysaccharide by streptococcus
mitis. Arch. oral Biol. 8, 319-329, 1963.
- 32.) GIBBONS, R.J., Studies of the predominant cultivable
SOCRANSKY, S.S., microbiota of dental plaques. Arch.
ARANJO, W.C. und oral Biol. 2, 365-370, 1964.
van HOUTE, J.:
- 33.) GRENBY, Th.: The effects of some carbohydrates on
experimental dental caries in the rat.
Arch. oral Biol. 8, 27-30, 1963.
- 34.) GUSTAFSON, B.E., The Vipeholm dental caries study;
QUENSEL, C.E., the effect of different levels of
LANKE, L.S., carbohydrate intake on caries activi-
LUNDQVIST, C., ty in 436 individuals observed for
GRAHNEN, H., five years. Acta odont. scand. 11,
BONOW, B.E. und 232-364, 1954, zit. nach 17.
KRASSE, B.:
- 35.) GUSTAFSON, G., Experimental dental caries in golden
STELLING, E. und hamsters with special reference to
BRUNIUS, E.: the examination and recording techni-
que. Odont. Tidskr. 60, 103-154, 1952,
zit. nach 17.
- 36.) GUSTAFSON, G., Experiments with various fats in the
STELLING, E., cariogenic diet. Experimental dental
ABRAMSON, E. und caries in golden hamsters IV. Acta
BRUNIUS, E.: odont. scand. 13, 75-84, 1955, zit.
nach 17.

- 37.) GUSTAFSON, G., The cariogenic effect of different
STELLING, E., carbohydrates in dry and moist diets.
ABRAMSON, E. und Experimental dental caries in golden
BRUNIOUS, E.: hamsters V. Odont.Tidskr. 63, 506-523,
1955, zit. nach 17.
- 38.) GUSTAFSON, G., The effect of cariogenic diet fed at
STELLING, E., intervals. Experimental dental caries
ABRAMSON, E. und in golden hamsters IX. Arch.oral Biol.
BRUNIOUS, E.: 1, 42-47, 1959.
- 39.) HARDWICK, J.L.: Isotope studies on the penetration of
glucose into normal and carious ena-
mel and dentine. Arch.oral Biol. 4,
97-100, 1961.
- 40.) HARTLES, R.L. Experimental dental caries in the albi-
und
LAWTON, F.E.: no rat. Incidence of caries in animals
maintained on powered purified diets
containing either 67% sucrose or 67%
potato starch. Brit.J.Nutr. 11, 13-18,
1957.
- 41.) HARTLES, R.L. Dental caries in relation to nutrition.
und SLACK, G.L.: Structueell effects. Brit.Nutr.Soc.
London 18, 78-85, 1959, zit. nach 17.
- 42.) HEHRE, E.J. und The conversion of sucrose to a poly-
HAMILTON, D.M.: saccharide of the starchglycogen class
by Neisseria from the pharynx. J.Bact.
55, 197, 1948.
- 43.) HEHRE, E.J. und Bacterial synthesis of an amylopectin-
HAMILTON, D.M.: like polysaccharide from sucrose.
J.biol.Chem. 166, 777-778, 1946.
- 44.) HELMCKE, J.G.: Verteilung der Bakterien in der Karies-
front. Dtsch.Zahnärztl.Z. 21, 1078-1085,
1966.

- 45.) HERRMANN, M. und Tierexperimentelle Untersuchungen
CREMER, H.: über Ernährung und Zahnkaries. Auswirkungen auf Struktur und chemischen Aufbau der Zähne. Dtsch.Zahnärztl.Z. 8, 61-68, 1953.
- 46.) HESS, W.C. und The salivary amylase activity of carious and noncarious individuals.
SMITH, B.T.: J.dentRes. 27, 593-598, 1948.
- 47.) HOERMANN, K.C. On the determination of human saliva
und aldolase activity. J.dent.Res. 36,
ROBINSON, W.E.: 852-861, 1957.
- 48.) KEYES, P.H.: Recent advances in dental caries research. Bacteriology. Internat.
dent.J. 12, 443-464, 1962.
- 49.) KITE, O.W., An influence on dental caries incidence
SHAW, J.H. und produced in rats by tube-feeding. J.dent.Res. 29, 668-669, 1950.
SOGNAES, R.F.:
- 50.) KRÖNCKE, A. und Biochemische Speicheluntersuchungen,
NAUJOKS, R.: V. Weitere Ergebnisse zur Entwicklung eines biochemischen Kariestestes. Dtsch.Zahnärztl.Z. 2, 565-567, 1954.
- 51.) KRÖNCKE, A. und Amylaseaktivität und Atmung. Arch.
LÄSSIG, L.: oral Biol. 5, 31-37, 1961.
- 52.) LAMMERS, T.: Nährbodeneigenschaften der Mundhöhle
und ihre klinische Bedeutung. Dtsch.
Zahnärztl.Z. 7, 569-573, 1953.
- 53.) LUNDQVIST, C.: Oral sugar clearance; its influence
on dental caries activity. Odont.
Revy 3, Suppl. 1, 1952, zit. nach 17.
- 54.) MacGREGOR, A.B.: The position and extent of acid in
the carious process. Arch.oral Biol. 4, 86-91, 1961.

- 55.) MacGREGOR, A.B.: The role of physical properties of food in dental caries. Bibl. "Nut. et Dieta" (Basel) 5, 119, 1964.
- 56.) MANLY, R.S.: Retention of carbohydrate from sugar solutions by salivary sediment. J.dent.Res. 40, 379, 1961.
- 57.) MAZZARELLA, M.A. Studies on oral Veillonella. und J.dent.Res. 39, 685, 1960.
SHKLAIR, I.L.:
- 58.) NAUJOKS, R. und Biochemische Speicheluntersuchungen, VONDERLINN, R.: IV. Klinische Überprüfung der Möglichkeiten zur Entwicklung eines biochemischen Kariestestes auf der Grundlage des Sauerstoffverbrauchs des menschlichen Speichels. Zahnärztl. Rdsch. 62, 438-440, 1953.
- 59.) NAUJOKS, R., Beziehungen zwischen der Aldolaseaktivität des Speichels und der Karies. BRAMSTEDT, F., Arch.oral Biol. 4, 179-186, 1961.
RANKE, E. und
KRÖNCKE, A.:
- 60.) NEUBAUER, T. und Über die Spaltung von Saccharose und NAUJOKS, R.: Maltose im menschlichen Speichel. Arch.oral Biol. 6, 221-227, 1961.
- 61.) NEUBAUER, T. und Polysaccharidbildung aus Saccharose BERGER, U.: durch einen "saccharosenegativen" Keim: *Neisseria flavescens*. Naturwissenschaften 48, 405, 1961.
- 62.) NEUWIRTH, I. und The production of acids from glucose SUMMERSON, W.H.: by oral microorganisms: Lactic and pyruvic acids. J.dent.Res. 30, 100-111, 1951.
- 63.) NEUWIRTH, I. und The production of acids from glucose BAERGER, P.J.: by oral microorganisms: acids of the Krebs cycle. J.dent.Res. 36, 769-770, 1957.

- 64.) OELSCHLÄGER, J.: Zahnmedizinische Dissertation.
Würzburg, 1964.
- 65.) ORLAND, F.J. Use of the germfree technic in the
et alii : study of experimental dental caries.
J.dent.Res. 33, 147-174, 1954.
- 66.) OSBORNE, D.G., Formations of mucinous polysaccharids
HACKEDORN, H.M. from sucrose by oral bacteria.
und SNYDER, M.L.: J.dent.Res. 30, 302, 1951.
- 67.) PAZUREK, S.: Die Gebisschäden bei unseren Schul-
kindern und die Wege für ihre plan-
mässige Bekämpfung. Zahnärztl.Mitt.
39, 93-95, 1949.
- 68.) PEDERSEN, P.O.: Ernährung und Zahnkaries primitiver
und urbanisierter Grönländer. Dtsch.
Zahn-, Mund- u. Kieferhkl. 6, 728-734, 1939.
- 69.) RICHARDSON, R.L. A bacteriologic census of human saliva.
und JONES, M.: J.dent.Res. 37, 697-709, 1958.
- 70.) ROOS, A.: Das Kariesproblem in der Nachkriegs-
zeit. Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 62,
688-692, 1952.
- 71.) RUSSEL, A.L.: International nutrition surveys: A
summary of preliminary dental fin-
dings. J.dent.Res. 42, 233-244, 1963.
- 72.) SCHULERUD, A.: Dental caries and nutrition during
wartime in Norway. Oslo, Fabritius u.
Sonners Trykkeri, 77pp, 1950, zit.nach
17.
- 73.) SHAFER, W.G.: The caries producing capacity of
starch, glucose and sucrose diets
in the Syrian hamster.
Science 110, 143-144, 1949.

- 74.) SHAW, J.H.: The effect of carbohydratefree and carbohydrate-low diets on the incidence of dental caries in white rats. J.Nutr.53, 151-162, 1954.
- 75.) SNYDER, M.L., The synthesis of mucinous polysaccharides from sucrose by oral bacteria. HACKEDORN, H.M., und J.dent.Res.34, 368-379, 1955.
MARTIN, D.O. und JOHNSTON, D.D.:
- 76.) STÅLFORS, A.: Investigation into the bacterial chemistry of dental plaques. Odont. Tidskr.58, Nr.3-4, 1950, zit. nach 17.
- 77.) SWENANDER Influence on salivary sugar of certain properties of foodstuffs and individual oral conditions. Acta odont. scand.15, 156p., 1957, zit. nach 17.
LANKE, L.S.:
- 78.) TENSCHER, G.W. Retention of reducing sugars in saliva after mastication of carbohydrates. und FOSDICK, L.S.: J.dent.Res.16, 354, 1937.
- 79.) THOMA, K.H.: Oral pathology, 4. Aufl. St. Louis, C.V. Mosby Co., 1954, zit. nach 7.
- 80.) TOVERUD, G.: Dental caries in Norwegian children during and after the Second World War. J.Amer.dent.Ass.26, 673-680, 1950.
- 81.) TRÜMPER, O.: Die Aldolaseaktivität im Speichel kariesfreier und kariesbefallener Personen. Dtsch.Zahnärztl.Z.21, 1147-1153, 1966.
- 82.) VOLKER, J.F. Some observations on the clearance of glucose from the oral cavity. J.dent. und PINKERTON, D.M.: Res.26, 9-13, 1947.
- 83.) WOOD, J.M. und The extracellular polysaccharide produced from sucrose by a cariogenic streptococcus. Arch.oral Biol.11, 1039-1042, 1966.
CRITCHLEY, P.:

LEBENS LAUF

Am 8.7.1939 als Sohn des Tierarztes Dr. Max Hermann und seiner Frau Annemarie, geb. Alberstoetter, in Schrobenhausen/Oberbayern geboren, besuchte ich von Herbst 1945 bis Juli 1950 die dortige Volksschule. Ab September 1950 war ich Schüler am Humanistischen Gymnasium des Benediktinerklosters Scheyern bei Pfaffenhofen a.d. Ilm, wo ich am 15. Juli 1959 mit dem Abitur abschloss. Nach der einjährigen Militärdienstzeit bei den Pionieren in Ingolstadt begann ich das Zahnmedizinstudium an der Universität München, wo ich nach dem Sommersemester 1963 das Physikum bestand. Mein klinisches Studium setzte ich im Winterhalbjahr 1963/64 an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg fort. Dort schloss ich nach dem Wintersemester 1965/66 mein Studium mit dem Staatsexamen ab. Seit 1. Februar 1967 bin ich als Assistent in Schwäbisch Gmünd tätig.

Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausser der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere weiter ehrenwörtlich, dass ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Helf Hermann

BÖHLER-DRUCK

87 WÜRZBURG, Wirsbergstr. 10
Tel. 5 41 43